

การสังเคราะห์ส่วนของไดแอมิโนของโอเซลทามิเวียร์

Synthesis of diamino moieties of oseltamivir



โดย

นายคณุตม์ ตั้งสง่าศักดิ์ศรี

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2556

เรื่อง การสังเคราะห์ส่วนของไดเอมิโนของโอเซลทามิเวียร์
โดย นายคุณุตม์ ตั้งสง่าศักดิ์ศรี
ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรุณศิริ ชิตางกูร)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ยงศักดิ์ ศรีธนาอนันต์)

.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร. อนวัช อาชวาคม)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดย หัวหน้าภาควิชาเคมี

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. วุฒิชัย พาราสุข)

หัวหน้าภาควิชาเคมี

วัน เดือน พ.ศ.

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ การสังเคราะห์ส่วนของไดแอมิโนของโอเซลทามิเวียร์

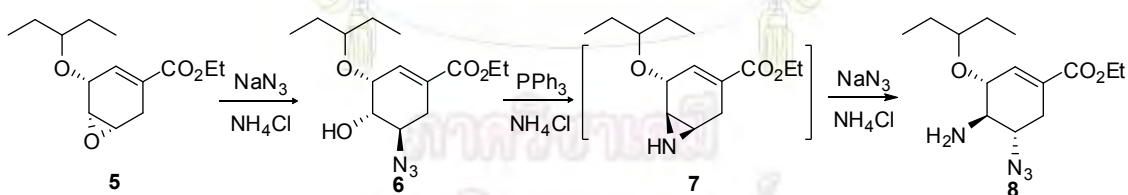
ชื่อนิสิตในโครงการ นายคุณุตม์ ตั้งสง่าศักดิ์ศรี เลขประจำตัว 5333062023

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ยงศักดิ์ ศรีธนาอนันต์

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2556

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาปฏิกิริยาการสังเคราะห์ amino azide **8** ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของขั้นตอนในการสังเคราะห์โอเซลทามิเวียร์ ที่ใช้สารตั้งต้นเป็น epoxide **5** โดยขั้นตอนสำคัญจะผ่านปฏิกิริยาการเปิดวงของ epoxide และ aziridine โดยสามารถรวบขั้นตอนในการทำปฏิกิริยาให้น้อยลง จาก 3 ขั้นตอน เหลือเพียงขั้นตอนเดียว ซึ่งไม่มีการแยกสารตัวกลางให้บริสุทธิ์ได้ปริมาณผลได้ของสาร **8** ถึง 88 % นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาถึงผลของตัวทำละลายที่ใช้ในการสังเคราะห์ที่มีการรวบขั้นตอนนี้ พบว่าเมื่อใช้ตัวทำละลายเป็น DMSO จะให้ปริมาณผลิตภัณฑ์ **8** สูงที่สุด อีกทั้งยังได้ทำการศึกษาผลของฟอสฟอรัสเอเจนต์ที่ใช้พบว่า เมื่อเปลี่ยนจาก phosphine เป็นสารประกอบประเภท phosphite หรือ phosphine-polymer bound สารตั้งต้น **6** เกิดปฏิกิริยาไปข้างหน้าได้ แต่ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ และเมื่อทดลองนำวิธีการสังเคราะห์ amino azide **8** ไปใช้กับ styrene oxide พบว่าสารเกิดการเปลี่ยนแปลงในทิศทางที่จะได้ผลิตภัณฑ์ แต่ยังไม่สามารถแยกออกมาได้

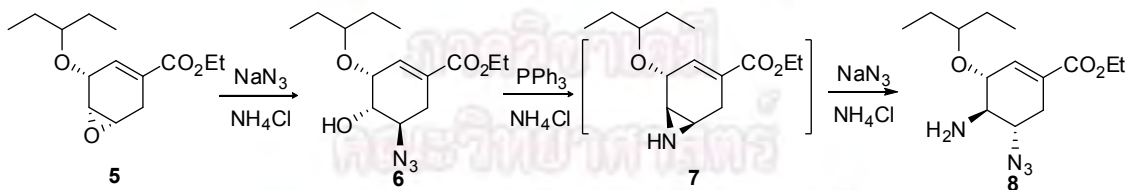


คำสำคัญ: oseltamivir, epoxide, amino azide

Title Synthesis of diamino moieties of oseltamivir
Student name Mr. Kanut Tangsangasakri ID 5333062023
Advisor Assist. Prof. Dr. Yongsak Sritana-anant
Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic year 2013

Abstract

The studies of the synthesis of the amino azide **8**, which is part of the synthesis of oseltamivir, were carried out using epoxide **5** as the starting material. The key steps were the ring-opening of epoxide and aziridine. The previously reported 3-step synthesis was successfully reduced to just one step without any intermediates purifications, and gave the product **8** in 88 % yield. Moreover, the effect of solvent on the process was studied and found that the highest yield of amino azide **8** was obtained when using DMSO as the solvent. Furthermore, the phosphorus reagent was changed from phosphine to phosphite or phosphine-polymer bound and found that the precursor **6** progressed through the reaction, but could not reach the targeted product. Additionally, the attempt to apply this reaction on styrene oxide could convert the reactant along the reaction path. However, the expected product was yet unable to be isolated.



Keywords: oseltamivir, epoxide, amino azide

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้ประสบความสำเร็จได้ด้วยความกรุณาอย่างสูงจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ยงศักดิ์ ศรีธนาอนันต์ เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ซึ่งได้ให้ความรู้ คำแนะนำ และคำปรึกษา ต่าง ๆ ที่มีประโยชน์ตลอดระยะเวลาในการทำวิจัย ตลอดจนให้ความช่วยเหลือด้านอุปกรณ์ และ สารเคมีที่จำเป็นต้องใช้ในการทำวิจัย รวมไปถึงการให้คำแนะนำในการเขียนรายงานฉบับนี้ ทำให้ สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้ด้วย

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรุณศิริ ชิตางกูร และ อาจารย์ ดร. อนวัช อาชวา คม ที่กรุณาสละเวลาอันมีค่าและให้เกียรติเป็นคณะกรรมการสอบในครั้งนี้ และขอขอบคุณโครงการ การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ของคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุน สนับสนุนในการดำเนินการวิจัยในครั้งนี้ รวมทั้งภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์ในเรื่องสถานที่และสารเคมีที่ใช้ทำการทดลอง ตลอดจนบุคลากร ภาควิชาเคมีทุกท่านที่ให้การสนับสนุนใน้งานวิจัยนี้สำเร็จไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณทุนโครงการพัฒนาและส่งเสริมผู้มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และ เทคโนโลยี (โครงการ พสวท.) ที่ได้ให้โอกาส และสนับสนุนค่าใช้จ่ายในการศึกษารวมทั้งการทำ การวิจัย รวมถึงการดำเนินการต่าง ๆ ที่ทำให้การทำวิจัยครั้งนี้ ประสบความสำเร็จด้วยดี

สุดท้ายนี้ ขอขอบพระคุณสมาชิกในกลุ่มวิจัยของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ยงศักดิ์ ศรีธนาอนันต์ รวมถึงสมาชิกในห้องปฏิบัติการชั้น 14 ทุกท่าน ที่คอยให้คำปรึกษา และ คำแนะนำต่าง ๆ อันมีประโยชน์อย่างยิ่งต่องานวิจัย รวมทั้งคุณพ่อคุณแม่ ครอบครัว และเพื่อน ๆ ทุก คนที่ได้ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จอย่างสมบูรณ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญภาพประกอบ	ช
สารบัญตาราง	ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 โรคไข้วัดใหญ่	1
1.2 เชื้อไวรัสไข้วัดใหญ่	3
1.3 คุณสมบัติของเชื้อไวรัสไข้วัดใหญ่	4
1.4 แอนติเจนของเชื้อไวรัสไข้วัดใหญ่	5
1.5 ยารักษาโรคไข้วัดใหญ่	7
1.6 มूलเหตุจูงใจ	8
1.7 วัตถุประสงค์	11
บทที่ 2 การทดลอง	
2.1 เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้	12
2.2 วิธีการทดลอง	13



สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	
3.1 การสังเคราะห์ hydroxyl azide 6 และ 10	22
3.2 การสังเคราะห์ amino azide 8 จาก hydroxyl azide 6 และ 10	23
3.3 การสังเคราะห์ amino azide 8 จาก epoxide 5	24
3.4 การทำปฏิกิริยาบน styrene oxide	30
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง	32
บรรณานุกรม	35
ภาคผนวก	38
ประวัติผู้ทำการวิจัย	45



 ภาควิชาเคมี
 คณะวิทยาศาสตร์
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญแผนภาพประกอบ

	หน้า
รูปที่ 1.1 แสดงรูปร่างและส่วนประกอบของไวรัสไข้หวัดใหญ่	5
รูปที่ 1.2 แสดงวงจรชีวิตของไวรัสไข้หวัดใหญ่	7
รูปที่ 1.3 โครงสร้างของ oseltamivir phosphate (Tamiflu [®]) 1 และ zanamivir (Relenza [®]) 2	8
รูปที่ 1.4 การสังเคราะห์ oseltamivir phosphate 1	9
รูปที่ 1.5 การสังเคราะห์ oseltamivir phosphate โดย azide route ของ Rohloff และ Karpf	10
รูปที่ 2.1 การสังเคราะห์ hydroxyl azide 6 และ 10	13
รูปที่ 2.2 การสังเคราะห์ amino azide 8 จาก hydroxyl azide 6 และ 10	14
รูปที่ 2.3 การสังเคราะห์ amino azide 8 จาก epoxide 5	15
รูปที่ 2.4 การสังเคราะห์ amino azide 14 และ 15 จาก epoxide 11	20
รูปที่ 3.1 การสังเคราะห์ hydroxyl azide 6 และ 10	22
รูปที่ 3.2 การสังเคราะห์ amino azide 8 จาก hydroxyl azide 6 และ 10	23
รูปที่ 3.3 การสังเคราะห์ amino azide 8 จาก epoxide 5	24
รูปที่ 3.4 แสดงโครงสร้างของ amino azide 8	26
รูปที่ 3.5 แสดงกลไกปฏิกิริยารีดักชันและการปิดวงไปเป็น aziridine 7	27
รูปที่ 3.6 การสังเคราะห์ amino azide 14 และ 15 จาก Styrene oxide 11	30

สารบัญแผนภาพประกอบ (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 4.1 การสังเคราะห์ hydroxyl azide 6 และ 10	32
รูปที่ 4.2 การสังเคราะห์ amino azide 8 จาก hydroxyl azide 6 และ 10	32
รูปที่ 4.3 การสังเคราะห์ amino azide 8 จาก epoxide 5	33
รูปที่ 4.4 การสังเคราะห์ amino azide 8 จาก hydroxyl azide 6 และ 10 โดยเปลี่ยนรีเอเจนต์ในขั้นที่ (2)	33
รูปที่ 4.5 การสังเคราะห์ amino azide 14 และ 15 จาก epoxide 11	34

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 3.1 แสดงการสังเคราะห์สาร hydroxyl azide 6 และ 10	23
ตารางที่ 3.2 แสดงการสังเคราะห์สาร amino azide 8 จาก hydroxyl azide 6 และ 10	24
ตารางที่ 3.3 แสดงการสังเคราะห์สาร amino azide 8 ตามรูปที่ 3.3	25
ตารางที่ 3.4 แสดงข้อมูลสัญญาณ ^1H NMR ของ amino azide 8	26
ตารางที่ 3.5 แสดงการสังเคราะห์สาร amino azide 8 ตามรูปที่ 3.3 โดยเปลี่ยน phosphine รีเอเจนต์ในขั้นที่ (2)	28



ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

หน่วย

°C	degree Celsius
Eq	equivalent
g	gram
mL	milliliter
mmol	millimole

สารเคมี

EtOH	ethanol
EtOAc	ethyl acetate
DMF	dimethylformamide
DMSO	dimethylsulfoxide
NMP	<i>N</i> -methyl-2-pyrrolidone

สัญลักษณ์และคำย่อ

¹³ C NMR	carbon-13 nuclear magnetic resonance
¹ H NMR	proton nuclear magnetic resonance
R _f	retardation factor
TLC	thin layer chromatography
δ	chemical shift

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 โรคไข้หวัดใหญ่

โรคไข้หวัดใหญ่^{1,2} (Influenza) เป็นโรคติดต่อของสัตว์ปีกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม มักเกิดจากการติดเชื้อไวรัสในสกุล Orthomyxoviridae ซึ่งก่อให้เกิดอาการต่างๆ เช่น อาการหนาวสั่น เป็นไข้ คัดจมูก เจ็บคอ เป็นต้น และในกรณีที่รุนแรงนั้น เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สามารถที่จะทำให้เกิดโรคปอดบวม ซึ่งอาจทำให้ถึงแก่ชีวิตได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเด็กและผู้สูงอายุ ไข้หวัดใหญ่จะเป็นโรคที่มีอาการรุนแรงกว่าไข้หวัด ซึ่งเกิดจากไวรัสต่างชนิดกัน ไข้หวัดใหญ่อาจทำให้เกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเด็ก โดยทั่วไป ไข้หวัดใหญ่ติดต่อผ่านอากาศ โดยการไอหรือจาม ซึ่งปลดปล่อยละอองที่มีไวรัส นอกจากนี้ไข้หวัดใหญ่ยังสามารถส่งผ่านโดยการสัมผัสโดยตรงกับมูกหรือสารคัดหลั่งจากจมูกของนก หรือผ่านการสัมผัสกับพื้นผิวที่ปนเปื้อนเชื้อไวรัสชนิดนี้ ซึ่งคาดกันว่าละอองที่ลอยมาทางอากาศเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่มากที่สุด ไวรัสไข้หวัดใหญ่สามารถที่จะทำให้ลดความรุนแรงลงได้ด้วยแสงแดด สารฆ่าเชื้อ และสารชะล้าง

เมื่อไวรัสไข้หวัดใหญ่เข้าสู่ร่างกาย จะมีระยะในการฟักตัว 1-4 วัน โดยผู้ที่ได้รับเชื้อไวรัสจะสามารถแพร่เชื้อไวรัสได้ตั้งแต่ 1 วัน ก่อนมีอาการ และสามารถแพร่เชื้อต่อไปได้อีก 3-5 วัน หลังแสดงอาการ และจะเริ่มแสดงอาการหลังจากได้รับเชื้อ 1-4 วัน ผู้ป่วยจะมีไข้แบบทันทีทันใด (38 °C ในผู้ใหญ่ และมักมีค่าสูงกว่าในเด็ก) ปวดศีรษะ ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ อ่อนเพลีย ถ้าป่วยด้วยโรคนี้เป็นระยะเวลานานอาจมีอาการไอจากหลอดลมอักเสบได้ ผู้ที่ป่วยด้วยโรคนี้ส่วนใหญ่จะหายเป็นปกติภายใน 1-2 สัปดาห์

สำหรับการรักษาโรคไข้หวัดใหญ่ทำได้โดยการให้ยาต้านไวรัส ภายใน 48 ชั่วโมง เป็นเวลา 3-5 วัน จะช่วยลดอาการและจำนวนเชื้อไวรัสในสารคัดหลั่งที่ทางเดินหายใจลงได้ แต่ในช่วงหลังของการรักษาด้วยยาต้านไวรัส อาจพบการดื้อยาตามด้วยการแพร่เชื้อไปยังคนอื่นได้ ในกรณีนี้อาจต้องให้ยาต้านไวรัสแก่ผู้เสี่ยงโรคสูงที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม และถ้ามีอาการแทรกซ้อนจากเชื้อแบคทีเรีย ต้องให้ยาปฏิชีวนะด้วย

การระบาดใหญ่ของโรคไข้หวัดใหญ่ในอดีตจนถึงปัจจุบัน³ ได้แก่

- ปี พ.ศ. 2461-2462 เป็นเชื้อไวรัสสายพันธุ์ H1N1 หรือที่เรียกว่า Spanish flu มีผู้ติดเชื้อมากถึง 50 ล้านคน และเสียชีวิตประมาณ 20 ล้านคน
- ปี พ.ศ. 2500-2501 เป็นเชื้อไวรัสสายพันธุ์ H2N2 หรือที่เรียกว่า Asian flu มีผู้เสียชีวิตประมาณ 1-1.5 ล้านคน
- ปี พ.ศ. 2511-2512 เป็นเชื้อไวรัสสายพันธุ์ H3N2 หรือที่เรียกว่า Hong Kong flu มีผู้เสียชีวิตประมาณ 0.75-1 ล้านคน
- ปี พ.ศ. 2520-2521 เป็นการกลับมาระบาดของอีกครั้งของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ H1N1 แต่มีชื่อที่แตกต่างออกไปจากเดิมคือ Russian flu
- ปี พ.ศ. 2546-2553 เป็นเชื้อไวรัสสายพันธุ์ H5N1 หรือที่เรียกว่า Bird flu มีผู้เสียชีวิตประมาณ 300 คน
- ปี พ.ศ. 2552-2553 เป็นการกลับมาระบาดของอีกครั้งของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ H1N1 แต่มีชื่อที่แตกต่างออกไปจากเดิมคือ Swine flu มีผู้เสียชีวิตประมาณ 18,000 คน
- ปัจจุบัน มีการระบาดของไข้หวัดอีกหลายชนิด เช่น สายพันธุ์ H1N1, H5N1, H7N9, H5N8 และ H10N8 รวมทั้งเชื้อไวรัสสายพันธุ์ใหม่ที่ยังไม่มีข้อมูลที่แน่ชัดมากพอ ที่ยังคงอยู่ในขั้นตอนการวิเคราะห์

1.2 เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่

เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่⁴ หรือ influenza virus เป็นไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคไข้หวัดใหญ่ เดิมจัดเป็นพวก myxoviruses ซึ่งหมายถึง ไวรัสที่มีการติดเชื่อในเซลล์ของเยื่อเมือก ในปัจจุบัน myxoviruses จำแนกออกเป็น orthomyxoviruses และ paramyxoviruses โดยเชื้อไข้หวัดใหญ่นี้ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม orthomyxoviruses และถูกแบ่งออกเป็น 3 ชนิด คือ A, B และ C

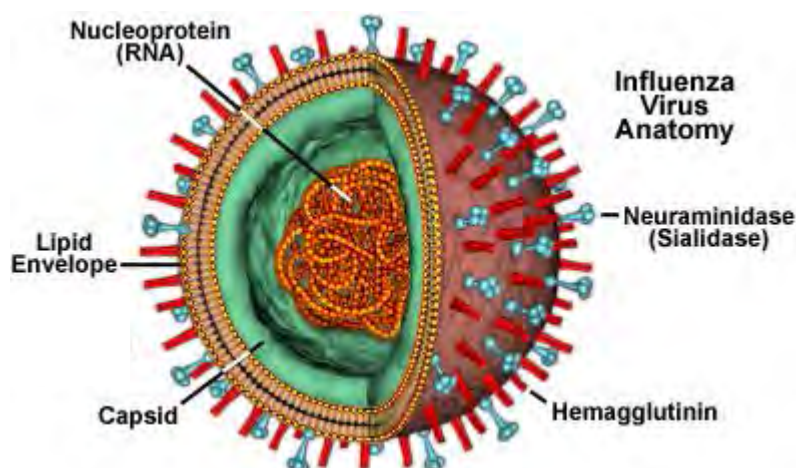
ไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A (influenza virus type A) ก่อให้เกิดการติดเชื่อในคนและสัตว์หลายชนิด เช่น ม้า หมู นก ไก่ เป็นต้น โรคไข้หวัดใหญ่ที่พบในคนมีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A ประมาณร้อยละ 80 นอกจากนี้ยังเป็นสาเหตุของการระบาดใหญ่ไปทั่วโลกอีกด้วย เชื้อไวรัสชนิดนี้เป็นชนิดที่มีการเปลี่ยนแปลงแอนติเจนของ hemagglutinin และ neuraminidase ไปจากเดิมจนกระทั่งเกิดเป็นเชื้อไวรัสชนิดใหม่ขึ้นอยู่เรื่อยๆ

ไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด B (influenza virus type B) เป็นสาเหตุของโรคไข้หวัดใหญ่ที่พบรองลงมาจากเชื้อไวรัสชนิด A และจะก่อให้เกิดการติดเชื่อในคนเท่านั้น มักพบในเด็กมากกว่าผู้ใหญ่ เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด B มีการเปลี่ยนแปลงแอนติเจนของ hemagglutinin เหมือนกันกับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A แต่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมมากพอที่จะกลายเป็นเชื้อไวรัสชนิดใหม่

ไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด C (influenza virus type C) ไม่ค่อยมีความสำคัญมากเท่ากับเชื้อไวรัสชนิด A และ B แต่มีรายงานการติดเชื่อในคนและหมู สำหรับการติดเชื่อในคนนั้นจะไม่แสดงอาการ หรือแสดงอาการอย่างอ่อน คุณสมบัติของไวรัสชนิดนี้ค่อนข้างแตกต่างไปจากเชื้อไวรัสชนิด A และ B

คุณสมบัติของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่

- มีรูปร่างหลายแบบ เช่น กลม หรือเป็นสายยาว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 100 นาโนเมตร
- มีจีโนมเป็น RNA สายเดี่ยว และแยกเป็นชิ้น โดยเชื้อไวรัสชนิด A และ B มี 8 ชิ้น ส่วนเชื้อไวรัสชนิด C มี 7 ชิ้น
- อนุภาคไวรัสประกอบด้วยแกนกลาง ซึ่งเป็น ribonucleoproteins (RNPs) จำนวน 7-8 ท่อน อยู่ใน envelope เดียวกัน โดย RNP แต่ละท่อนประกอบด้วยจีโนมหนึ่งชิ้น ล้อมรอบด้วย nucleoproteins subunits และมี RNA polymerase complex อยู่ด้วย โดย complex นี้ประกอบด้วยโปรตีน 3 ชนิด คือ PA, PB1 และ PB2 ไวรัสหนึ่งอนุภาค จะมี RNA polymerase complex ประมาณ 30-60 copies และ RNPs ทั้ง 7-8 ท่อนนี้จะถูกล้อมรอบด้วยชั้นของ matrix protein และชั้นนอกสุดคือ envelope ซึ่งเป็นส่วนประกอบของไขมันและไกลโคโปรตีน บน envelope มี spikes สองชนิดคือ hemagglutinin (H) ซึ่งมีรูปร่างเป็น rod shape และ neuraminidase (N) ซึ่งมีรูปร่างเหมือนดอกเห็ด
- เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่มี transcription และ genome replication เกิดขึ้นในนิวเคลียส ซึ่งแตกต่างจาก RNA virus ทั่วไป ที่มีการเพิ่มจำนวนในไซโตพลาสซึมเท่านั้น
- เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่เป็นไวรัสที่มี genetic recombination เกิดขึ้นบ่อย ซึ่งทำให้เกิดไวรัสสายพันธุ์ใหม่ขึ้นมา และเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดการระบาดใหญ่ไปทั่วโลก



รูปที่ 1.1 แสดงรูปร่างและส่วนประกอบของไวรัสไข้หวัดใหญ่⁵

แอนติเจนของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่

เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่มีแอนติเจนที่สำคัญ 2 ชนิด คือ

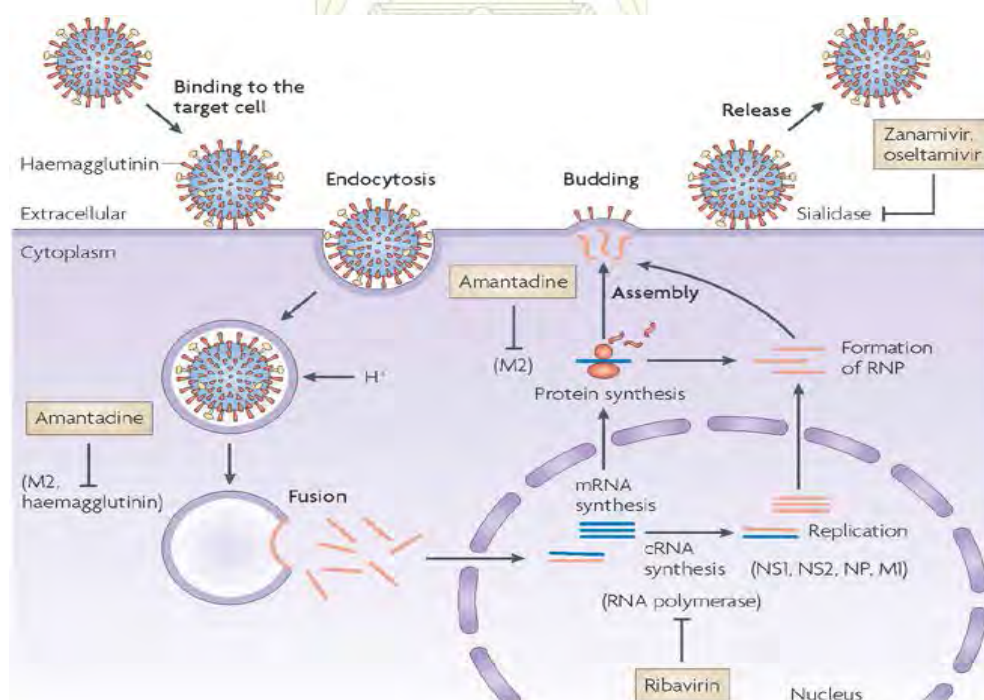
- hemagglutinin (H) ทำหน้าที่ในการจับกับตัวรับ (receptor site) บนผิวเซลล์ ทำให้ไวรัสสามารถเข้าสู่เซลล์ได้ ตัวรับ (receptor site) นี้ พบได้ในเมือกที่ปกคลุมทางเดินหายใจ และพบบนผิวเม็ดเลือดแดงด้วย โปรตีน hemagglutinin ของเชื้อไวรัสชนิด A ในปัจจุบันแบ่งออกเป็น 16 กลุ่มย่อย คือ H1 จนถึง H16 ซึ่งสามารถพบได้ในนกและสัตว์ชนิดอื่นๆ เช่น หมู ม้า แมว เป็นต้น แต่เชื้อที่พบในคนนั้นปัจจุบันมีอยู่ 3 กลุ่มย่อย คือ H1, H2 และ H3 ส่วนเชื้อไวรัสชนิด B และ C นั้น ยังไม่มีการแบ่งโปรตีน hemagglutinin ออกเป็นกลุ่มย่อย
- neuraminidase (N) เป็น receptor destroying enzyme (RDE) คือเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยไกลโคโปรตีน ซึ่งเป็นตัวรับ (receptor site) บนผิวเซลล์ ทำให้ไวรัสหลุดเป็นอิสระจากเซลล์ เนื่องจากโมเลกุลของไกลโคโปรตีนนี้พบได้ในเมือกที่ปกคลุมทางเดิน-

หายใจซึ่งทำให้ไวรัสถูกดักจับติดกับเมือกได้ เมื่อเมือกจับไวรัสไว้แล้ว ไวรัสจะใช้ เอนไซม์นี้ย่อย ทำให้เมือกใสขึ้น หลังจากนั้นไวรัสจึงออกไปบุกรุกเซลล์เยื่อบุทางเดินหายใจที่อยู่ลึกลงไป ปัจจุบันมีการค้นพบโปรตีน neuraminidase ทั้งสิ้น 9 กลุ่มย่อย คือ N1 จนถึง N9 โดยชนิดที่พบในคนนั้นเป็น N1 และ N2 ส่วนเชื้อไวรัสชนิด B และ C นั้น ยังไม่มีการแบ่งโปรตีน neuraminidase ออกเป็นกลุ่มย่อย

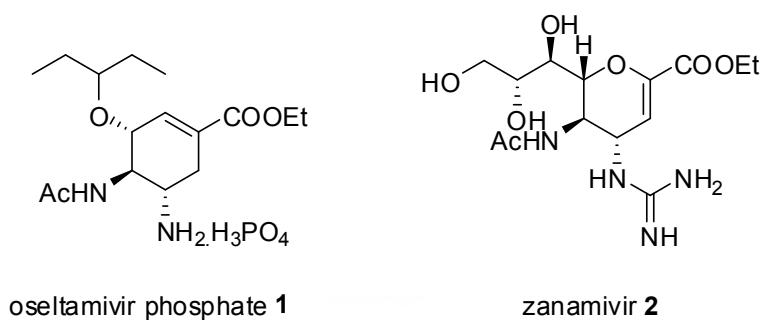
เมื่อไวรัสไข้หวัดใหญ่เข้าสู่ร่างกายผ่านทางหายใจ โปรตีน hemagglutinin ที่อยู่บนผิวของไวรัสจะจับกับ sialic acid (neuraminic acid) ที่อยู่บนผิวของเซลล์ที่เรียงกันอยู่ในระบบทางเดินหายใจ หลังจากนั้นไวรัสไข้หวัดใหญ่จะถูกเซลล์ดังกล่าวปกคลุม ทำให้ไวรัสสามารถปล่อยส่วนประกอบของมันเข้าสู่ไซโตพลาสซึมและเคลื่อนที่ผ่านเข้าไปยังนิวเคลียสของเซลล์ ต่อมาโปรตีนของไวรัสจะทำการจำลองแบบ RNA ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ และจะสร้าง mRNA ซึ่งสามารถที่จะถูกถอดรหัสให้กลายเป็นไวรัสจำนวนมาก จากนั้นไวรัสที่ถูกสร้างขึ้นมาก็จะเคลื่อนที่ผ่านไซโตพลาสซึมไปยังเยื่อหุ้มเซลล์ และจะถูกห่อหุ้มไว้ด้วยชั้นของโปรตีนและชั้นของลิพิด ไวรัสที่ถูกสร้างขึ้นใหม่นี้ก็จะเคลื่อนที่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์และจะถูกปลดปล่อยไปยังส่วนที่อยู่ภายนอกเซลล์เพื่อที่จะหาเซลล์ใหม่ที่จะบุกรุกเข้าไป แต่อย่างไรก็ตามการเพิ่มจำนวนของไวรัสก็สามารถที่จะขัดขวางได้ เนื่องจากไวรัสไข้หวัดใหญ่นั้นจะถูกคลุมไปด้วย sialic acid ซึ่งเป็นสารชนิดเดียวกันกับที่ยึดติดมันไว้ที่ภายนอกเซลล์ที่มันบุกรุกเข้ามา ถ้าสามารถทำให้ sialic acid ไม่เกิดการเคลื่อนที่ได้ ไวรัสก็ไม่สามารถที่จะเข้าไปภายในเซลล์ได้เช่นกัน โดยจะถูกยึดติดไว้ที่เยื่อหุ้มเซลล์ที่ไวรัสถูกสร้างขึ้นมา แต่เนื่องจากไวรัสมีโปรตีน neuraminidase ซึ่งสามารถที่จะตัด sialic acid ของไวรัสได้ ซึ่งส่งผลให้ไวรัสหลุดออกจากเซลล์ต้นกำเนิดได้ จึงทำให้ไวรัสสามารถเคลื่อนที่ไปยังเซลล์อื่นๆ ได้ต่อไป

1.3 ยารักษาโรคไข้หวัดใหญ่

การรักษาผู้ติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ทั้งสองชนิด มีวิธีการดูแลรักษาเหมือนการรักษาไข้หวัดใหญ่ทั่วไป คือการรักษาตามอาการ ส่วนการใช้ยาด้านไวรัสขึ้นอยู่กับอาการของผู้ป่วย การตรวจวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการ และการตัดสินใจของแพทย์ผู้ทำการรักษา ยาด้านไวรัสที่ใช้ในการรักษาไข้หวัดใหญ่ H5N1 และ H1N1 ที่ใช้อย่างแพร่หลายในขณะนี้มียอยู่ 2 ชนิด⁶ คือ oseltamivir phosphate มีชื่อทางการค้าว่า Tamiflu[®] ของบริษัท Roche ส่วนอีกชนิดหนึ่งคือ zanamivir หรือมีชื่อทางการค้าว่า Relenza[®] ของบริษัท Glaxo-Smith Kline ยาทั้ง 2 ชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของนิวรามินิเดส แต่ zanamivir มีรูปแบบเป็นผงแห้งสำหรับพ่นทางปาก ด้วยเครื่องพ่น จึงไม่สะดวกเท่า oseltamivir phosphate ซึ่งสามารถรับประทานได้ จึงทำให้ได้รับความนิยมมากกว่า



รูปที่ 1.2 แสดงวงจรชีวิตของไวรัสไข้หวัดใหญ่⁷

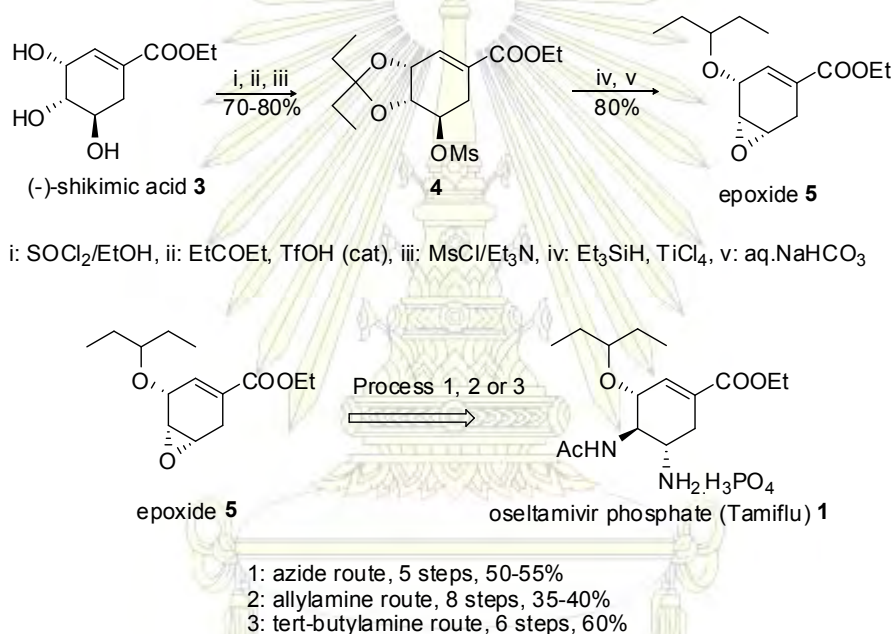


รูปที่ 1.3 โครงสร้างของ oseltamivir phosphate (Tamiflu[®]) 1 และ zanamivir (Relenza[®]) 2

1.4 มูลเหตุจูงใจ

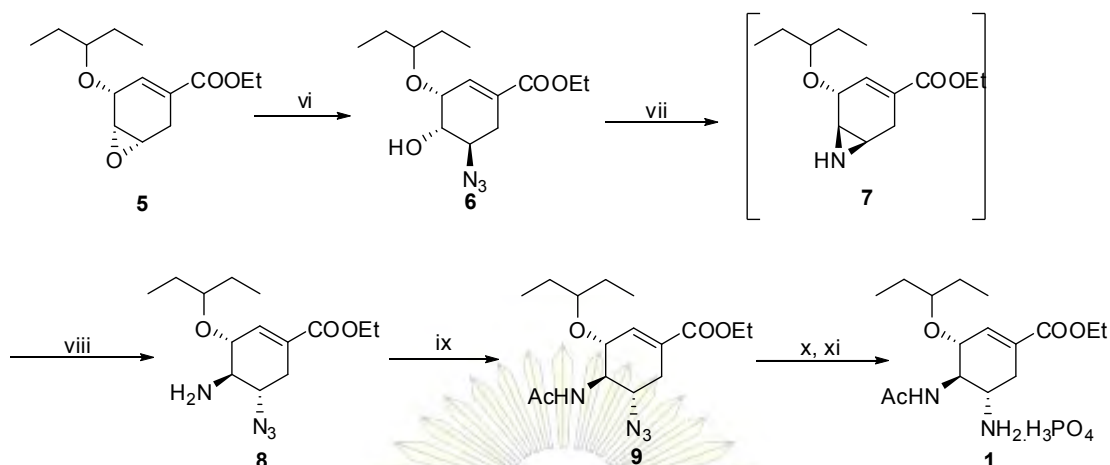
จากที่ได้ทราบมาแล้วว่าโรคไข้หวัดใหญ่เป็นโรคติดต่อที่มีการแพร่ระบาดไปทั่วโลก และยาที่ใช้ในการรักษาในปัจจุบันที่นิยมใช้คือ Tamiflu[®] ของบริษัท Roche หรือ oseltamivir phosphate 1 ถูกค้นพบราวปี ค.ศ. 1995 และได้มีการเปิดเผยรายละเอียดการสังเคราะห์ในวารสารวิชาการเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ.1997 อย่างไรก็ตาม วิธีที่กล่าวถึงนี้มีจำนวนขั้นตอนที่ค่อนข้างยาวและเหมาะกับการสังเคราะห์อนุพันธ์ที่มีโครงสร้างหลากหลายเพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์มากกว่าการผลิตในปริมาณมากๆ^{8,9} ต่อมาบริษัท Roche ได้พัฒนาวิธีการสังเคราะห์ในระดับอุตสาหกรรม โดยใช้สารตั้งต้นซึ่งเป็นสารที่สำคัญจากธรรมชาติคือ (-)-shikimic acid¹ ซึ่งเป็นสารตัวกลางสำคัญในกระบวนการชีวสังเคราะห์ของสารสำคัญหลายกลุ่มที่พบในพืชและจุลินทรีย์ เช่น แอลคาลอยด์กลุ่มอินโดลและไอโซควิโนลีน, ฟลาโวนอยด์, คูมาริน และแทนนิน เป็นต้น (-)-shikimic acid สกัดแยกได้จากพืชที่พบในประเทศจีนและญี่ปุ่น ชื่อ Japanese star anise หรือดอกโป๊ ยัก ก็ที่มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Illicium verum* L. และมีชื่อเรียกในภาษาญี่ปุ่นว่า "Shikimi" ซึ่งเป็นที่มาของชื่อ shikimic acid พืชชนิดนี้เป็นแหล่งธรรมชาติสำคัญที่ใช้ในการผลิต shikimic acid ทางการค้า

กระบวนการสังเคราะห์ oseltamivir phosphate ที่เริ่มต้นจาก (-)-shikimic acid¹⁰ จะมีขั้นตอนที่สำคัญ คือการสังเคราะห์ epoxide 5 สารดังกล่าวสามารถเปลี่ยนให้เป็น oseltamivir phosphate ด้วยเส้นทางที่แตกต่างกัน 3 เส้นทาง คือ 1. azide route^{11,12} 2. allylamine route¹³ และ 3. *tert*-butylamine route¹⁴ โดยทุกวิธีจะอาศัยหลักการเดียวกันคือเปลี่ยนหมู่ epoxide ให้กลายเป็นอะซิไรดีนที่มีสเตอริโอเคมีตรงกันข้าม แล้วตามด้วยการเปิดวงด้วยไนโตรเจนนิวคลีโอไฟล์ที่เหมาะสมก็จะได้ผลิตภัณฑ์ oseltamivir phosphate ตามต้องการ แสดงดังรูปที่ 1.4



รูปที่ 1.4 การสังเคราะห์ oseltamivir phosphate 1

ถ้าเปรียบเทียบทั้งสามวิธีแล้วจะเห็นว่า azide route มีจำนวนขั้นตอนที่น้อยและให้ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ค่อนข้างสูงและเป็นวิธีที่ใช้ในระดับอุตสาหกรรมโดยบริษัท Roche ดังนั้น azide route จึงเหมาะกับการพัฒนาปรับปรุงให้เข้ากับการผลิตในอุตสาหกรรมมากขึ้น ซึ่งวิธีการสังเคราะห์โดยกระบวนการ azide route คืองานวิจัยของ Rohloff¹¹ และ Karpf¹² พบว่าทั้งสองแบบมีขั้นตอนที่เปลี่ยน aziridine 7 เป็น acetylaminoazide 8 โดยใช้ตัวทำละลายเป็น DMF ในการทำปฏิกิริยา substitution ด้วย sodium azide เหมือนกัน แสดงดังรูปที่ 1.5



Rohloff : vi) NaN_3 , NH_4Cl , EtOH (100%) vii) PMe_3 , MeCN viii) NaN_3 , NH_4Cl , DMF
 ix) Ac_2O , pyr (35% from vii) x) H_2 , Lindlar catalyst xi) H_3PO_4 (80%)

Karpf : vi) NaN_3 , NH_4Cl , EtOH (100%) vii) PPh_3 , MeCN viii) NaN_3 , NH_4Cl , DMF
 ix) Ac_2O , aq NaHCO_3 (50-55% from vii) x) Raney Ni, H_2 xi) H_3PO_4 (88-91%)

รูปที่ 1.5 การสังเคราะห์ oseltamivir phosphate โดย azide route

จากงานวิจัยทั้งสองนี้มีจุดที่แตกต่างกันคือขั้นที่ (vii) ในรูปที่ 1.5 ที่เปลี่ยน hydroxyl azide 6 เป็น aziridine 7 Rohloff และคณะ¹¹ ได้ใช้ trimethylphosphine แต่ Karpf และคณะ¹² ใช้ triphenylphosphine เป็นรีเอเจนต์ในการทำปฏิกิริยาปิดวง aziridine ซึ่ง triphenylphosphine มีราคาสูงกว่า หาง่ายกว่า ไม่ระเหย และใช้งานได้ง่ายกว่า trimethylphosphine ที่มีราคาแพงเป็นของเหลวระเหยง่าย กลิ่นเหม็นรุนแรงและว่องไวต่ออากาศ ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้เลือกงานวิจัยของ Karpf เป็นแนวทางในการทำวิจัย ซึ่งจากงานวิจัยของ Legters และคณะ¹⁵ พบว่ามีการใช้ตัวทำละลายเป็น DMF เพื่อสังเคราะห์ aziridine 7 จาก hydroxyl azide 6 และจากงานวิจัยของ Popsavin และคณะ¹⁶ ได้ทำการทดลองเปิดวง epoxide ด้วย sodium azide โดยมีตัวทำละลายเป็น DMF จึงมีแนวโน้มว่าสามารถทำการสังเคราะห์ amino azide 8 โดยเริ่มจาก epoxide 5 ต่อเนื่องกันได้ในภาชนะเดียวกัน (one pot reaction)

โดยมี DMF เป็นตัวทำละลายในการทำปฏิกิริยา ปัจจัยอื่นๆ ที่อาจมีผลให้การสังเคราะห์มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นหรือเป็นทางเลือกจากวิธีการเดิมที่จะนำมาทดลองในโครงการนี้ได้แก่การใช้สารประกอบ phosphite ที่มีอันตรายน้อยกว่าแทน phosphine รีเอเจนต์ และเนื่องจากเมื่อใช้ phosphine รีเอเจนต์ จะทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียง (PPh_3O) ซึ่งทำให้การแยก amino azide **8** ที่สังเคราะห์ได้นั้นมีความยุ่งยาก เพราะต้องใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟีในการแยก¹⁷ แต่สำหรับ phosphite รีเอเจนต์นั้น จะทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียง ซึ่งเป็นสารประกอบประเภท phosphate ที่สามารถล้างออกได้ด้วยน้ำ ทำให้สามารถแยก amino azide **8** ได้ง่ายขึ้น และการใช้ phosphine-polymer bound รีเอเจนต์เพื่อที่จะสามารถนำรีเอเจนต์กลับมาใช้ใหม่ได้ ทำให้สามารถลดต้นทุนในการผลิต oseltamivir phosphate ในระดับอุตสาหกรรม รวมถึงช่วยลดการทิ้งขยะฟอสฟอรัสในสิ่งแวดล้อม และการใช้ polar aprotic solvent อื่นที่มีจุดเดือดสูงกว่า เช่น DMSO และ NMP ที่จะช่วยลดเวลาการทำปฏิกิริยาลง

1.5 วัตถุประสงค์

1. สังเคราะห์ส่วนของไดแอมิโนของโอเซลทามิเวียร์โดยควบรวมขั้นตอนการทำปฏิกิริยาหรือขั้นตอนการแยกผลิตภัณฑ์ให้น้อยลง
2. ศึกษาผลของการเปลี่ยนตัวทำละลายที่ใช้ในการสังเคราะห์ amino azide **8**
3. ศึกษาผลของการเปลี่ยน phosphine รีเอเจนต์เป็นสารประกอบประเภท phosphite และ phosphine-polymer bound

บทที่ 2 การทดลอง

2.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

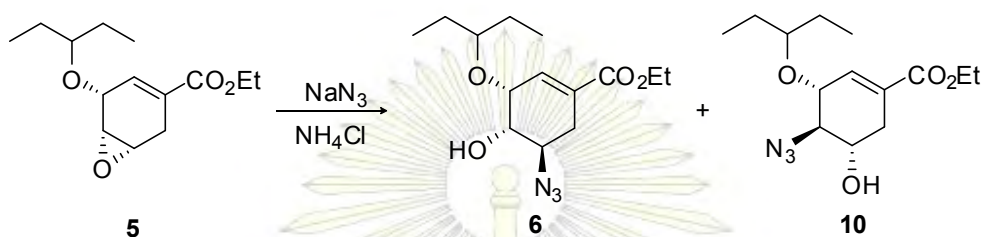
1. Rotary evaporator (r-200, Buchi, Switzerland)
2. เครื่องชั่ง PB403-S, METTLER TOLEDO, USA
3. NMR spectrometer (Varian Mercury +400, USA)

2.2 สารเคมี (reagent grade)

1. (3*R*,4*R*,5*S*)-4,5-epoxy-3-(1-ethylpropoxy)-1-cyclohexene-1-carboxylate (epoxide 5)
ด้วยความอนุเคราะห์จาก ดร. อรศิริ ศรีคุณ
องค์การเภสัชกรรม
2. acetone
3. 4-dimethylaminopyridine
4. dimethylformamide (DMF)
5. dimethylsulfoxide (DMSO)
6. ethanol (EtOH)
7. ethyl acetate (EtOAc)
8. methanol
9. 2-methyl-2-propanol
10. *N*-methyl-2-pyrrolidone (NMP)
11. pyridine
12. sodium azide
13. styrene oxide
14. tributylphosphite
15. triphenylphosphine
16. triphenylphosphine-polymer bound
17. triphenylphosphite

2.3 วิธีการทดลอง

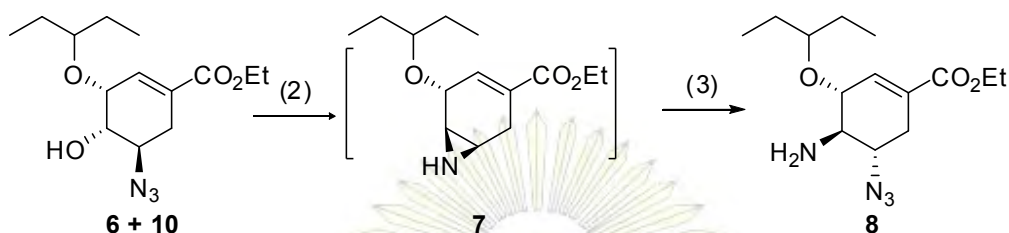
2.3.1 การสังเคราะห์ hydroxyl azide 6 และ 10 จาก epoxide 5



รูปที่ 2.1 การสังเคราะห์ hydroxyl azide 6 และ 10

ชั่งน้ำหนัก epoxide **5** (399 mg, 1.57 mmol) ใส่ในขวดก้นกลมขนาด 50 mL และชั่ง sodium azide (NaN_3 , 504 mg, 7.85 mmol) และ ammonium chloride (NH_4Cl , 425 mg, 7.85 mmol) นำลงไปเทใส่ในขวดก้นกลม จากนั้นนำไปต่อเข้ากับ drying tube ที่บรรจุ anhydrous calcium chloride อยู่ และใช้ sand bath เป็นตัวให้ความร้อน จากนั้นละลายสารผสมด้วย ethanol ประมาณ 20 mL และให้ความร้อนประมาณ 50 °C เป็นเวลา 2 วัน ติดตามปฏิกิริยาด้วยเทคนิค TLC โดยระบบที่ใช้คือ Hexane : EtOAc ในอัตราส่วน 6:4 แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม hexane เพื่อตกตะกอน sodium azide และ ammonium chloride ที่เหลือ จากนั้นจึงกรองของแข็งออก และนำสารละลายที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออก

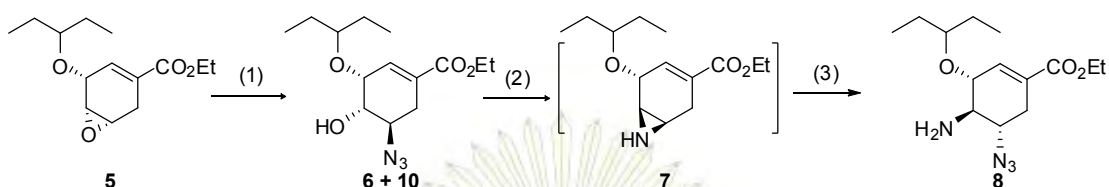
2.3.2 การสังเคราะห์ amino azide 8 จาก hydroxyl azide 6 และ 10



รูปที่ 2.2 การสังเคราะห์ amino azide 8 จาก hydroxyl azide 6 และ 10

ซึ่งนำหนัก hydroxyl azide 6 และ 10 ที่ได้จากการสังเคราะห์ในปฏิกิริยาตามรูปที่ 2.1 (300 mg, 1.01 mmol) ใส่ในขวดก้นกลมขนาด 50 mL เติมตัวทำละลาย DMF ประมาณ 10 mL แล้วจึงชั่ง triphenylphosphine (PPh₃, 265 mg, 1.01 mmol) และ ammonium chloride (NH₄Cl, 5 g, 0.10 mmol) เติมลงไปในขวดก้นกลม จากนั้นนำไปต่อเข้ากับ drying tube ที่บรรจุ anhydrous calcium chloride อยู่ และใช้ sand bath เป็นตัวให้ความร้อน ที่อุณหภูมิประมาณ 70 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จึงทำปฏิกิริยาขั้นต่อไปโดยการเติม sodium azide (NaN₃, 99 mg, 1.52 mmol) และชั่ง ammonium chloride (NH₄Cl, 71 mg, 1.3 mmol) นำไปเทลงในขวดก้นกลม พร้อมกับต่อ condenser เข้ากับขวดก้นกลมและให้ความร้อนที่อุณหภูมิ reflux ของ DMF (ประมาณ 154 °C) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยการหยุดให้ความร้อนและเติมน้ำเพื่อให้ sodium azide และ ammonium chloride ที่มากเกินไปละลาย จากนั้นจึงสกัดสารละลายที่ได้ด้วย EtOAc แล้วจึงนำส่วนของ EtOAc ที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออก แล้วจึงแยกสารที่ได้ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้อัตราส่วนของ mobile phase คือ hexane : EtOAc = 6:4

2.3.3 การสังเคราะห์ amino azide 8 จาก epoxide 5



รูปที่ 2.3 การสังเคราะห์ amino azide 8 จาก epoxide 5

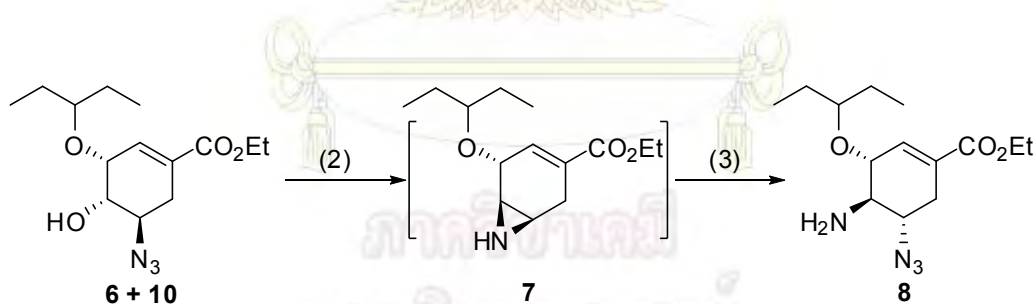
สำหรับขั้นตอนที่ (1) ชั่ง epoxide 5 (406 mg, 1.60 mmol) ใส่ในขวดก้นกลมขนาด 50 mL และชั่ง sodium azide (NaN_3 , 520 mg, 8 mmol) และ ammonium chloride (NH_4Cl , 428 mg, 8 mmol) นำไปเทใส่ในขวดก้นกลม จากนั้นนำไปต่อเข้ากับ drying tube ที่บรรจุ anhydrous calcium chloride อยู่ และใช้ sand bath เป็นตัวให้ความร้อน จากนั้นละลายสารผสมด้วย ethanol ประมาณ 20 mL และให้ความร้อนประมาณ $50\text{ }^\circ\text{C}$ เป็นเวลา 2 วัน แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม hexane เพื่อตกตะกอน sodium azide และ ammonium chloride ที่เหลือ จากนั้นจึงกรองของแข็งออก และนำสารละลายที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออก สำหรับขั้นตอนที่ (2) นำเอาผลิตภัณฑ์หยาบ (crude) ที่ได้ในขั้นตอนที่ (1) มาเติมตัวทำละลาย DMF ประมาณ 10 mL แล้วจึงชั่ง triphenylphosphine (PPh_3 , 420 mg, 1.6 mmol) และ ammonium chloride (NH_4Cl , 9 mg, 0.16 mmol) เติมลงไปลงในขวดก้นกลม จากนั้นนำไปต่อเข้ากับ drying tube และให้ความร้อนด้วย sand bath ที่อุณหภูมิประมาณ $70\text{ }^\circ\text{C}$ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง สำหรับขั้นตอนที่ (3) ชั่งน้ำหนัก sodium azide (NaN_3 , 156 mg, 2.4 mmol) และชั่ง ammonium chloride (NH_4Cl , 111 mg, 2.1 mmol) นำไปเทลงในขวดก้นกลม พร้อมกับต่อ condenser เข้ากับขวดก้นกลมและให้ความร้อนที่อุณหภูมิ

reflux ของ DMF (ประมาณ 154 °C) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยการหยุดให้ความร้อนและเติมน้ำเพื่อให้ sodium azide และ ammonium chloride ที่มากเกินไปละลาย จากนั้นจึงสกัดสารละลายที่ได้ด้วย EtOAc แล้วจึงนำส่วนของ EtOAc ที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออก แล้วจึงแยกสารที่ได้ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้อัตราส่วนของ mobile phase คือ hexane : EtOAc = 6:4

ทำการสังเคราะห์เช่นเดียวกับการสังเคราะห์ข้างต้นซ้ำอีก แต่เปลี่ยนตัวทำละลายในขั้นที่ (2) และ (3) เป็น DMSO และ NMP ตามลำดับ รวมทั้งลดเวลาในการให้ความร้อนในขั้นที่ (3) เป็น 1.5 ชม. และ 1.7 ชม. ตามลำดับ

2.3.4 การสังเคราะห์ amino azide 8 จาก hydroxyl azide 6 และ 10 โดยเปลี่ยน phosphine

รีเอเจนต์ในขั้นที่ (2)



รูปที่ 2.2 การสังเคราะห์ amino azide 8 จาก hydroxyl azide 6 และ 10

- การสังเคราะห์ครั้งที่ 1

สำหรับขั้นที่ (2) ชั่งน้ำหนัก hydroxyl azide **6** และ **10** (357 mg, 1.2 mmol) ใส่ในขวดก้นกลมขนาด 50 mL และนำ tributyl phosphite (0.33 mL, 1.2 mmol) และ ammonium chloride (NH_4Cl , 10 mg, 0.12 mmol) เติมใส่ในขวดก้นกลม ละลายสารผสมด้วย DMF ประมาณ 10 mL และต่อขวดก้นกลมเข้ากับ drying tube ที่บรรจุ anhydrous calcium chloride ใช้ sand bath เป็นตัวให้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 70 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง สำหรับขั้นที่ (3) เติม sodium azide (NaN_3 , 118 mg, 1.8 mmol) และ ammonium chloride (NH_4Cl , 84 mg, 1.6 mmol) และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ reflux ของ DMF (ประมาณ 154 °C) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเติม sodium azide (NaN_3 , 118 mg, 1.8 mmol) และ ammonium chloride (NH_4Cl , 84 mg, 1.6 mmol) เพิ่ม และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ reflux ของ DMF เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และเติม triphenylphosphine (416 mg, 1.2 mmol) เพิ่ม และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ reflux ของ DMF เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จึงหยุดปฏิกิริยาด้วยการหยุดให้ความร้อน

- การสังเคราะห์ครั้งที่ 2

ทำเช่นเดียวกับการสังเคราะห์ข้างต้น แต่สำหรับขั้นที่ (2) เพิ่ม tributyl phosphite (0.34 mL, 1.25 mmol) และ ammonium chloride (NH_4Cl , 7 mg, 0.125 mmol) ให้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 70 °C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง และในขั้นตอนที่ (3) เติม sodium azide (NaN_3 , 102 mg, 1.5 mmol) และ ammonium chloride (NH_4Cl , 84 mg, 1.38 mmol) และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ reflux ของ DMF เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นเติม sodium azide (NaN_3 , 81 mg,

1.25 mmol) และ ammonium chloride (NH_4Cl , 67 mg, 1.25 mmol) และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ reflux ของ DMF เป็นเวลาอีก 3 ชั่วโมง จากนั้นเติม zinc chloride (128 mg, 0.94 mmol) และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ reflux ของ DMF เป็นเวลาอีก 7 ชั่วโมง จึงหยุดปฏิกิริยาด้วยการหยุดให้ความร้อน

- **การสังเคราะห์ครั้งที่ 3**

ทำเช่นเดียวกับการสังเคราะห์ข้างต้น แต่ในขั้นที่ (3) เติม sodium azide (NaN_3 , 358 mg, 5.2 mmol) และ ammonium chloride (NH_4Cl , 278 mg, 5.2 mmol) และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ reflux ของ DMF เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จึงหยุดปฏิกิริยาด้วยการหยุดให้ความร้อน

- **การสังเคราะห์ครั้งที่ 4**

ทำเช่นเดียวกับการสังเคราะห์ข้างต้น แต่สำหรับขั้นที่ (2) ใช้ triphenyl phosphite (397 mg, 1.34 mmol) และ ammonium chloride (10 mg, 0.13 mmol) เป็นรีเอเจนต์ในการทำปฏิกิริยาแทน tributyl phosphite และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ $70\text{ }^\circ\text{C}$ เป็นเวลา 8 ชั่วโมง และในขั้นที่ (3) นั้นทำปฏิกิริยาเหมือนกับการสังเคราะห์ครั้งที่ 1 โดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ reflux ของ DMF เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จึงหยุดปฏิกิริยาด้วยการหยุดให้ความร้อน

- การสังเคราะห์ครั้งที่ 5

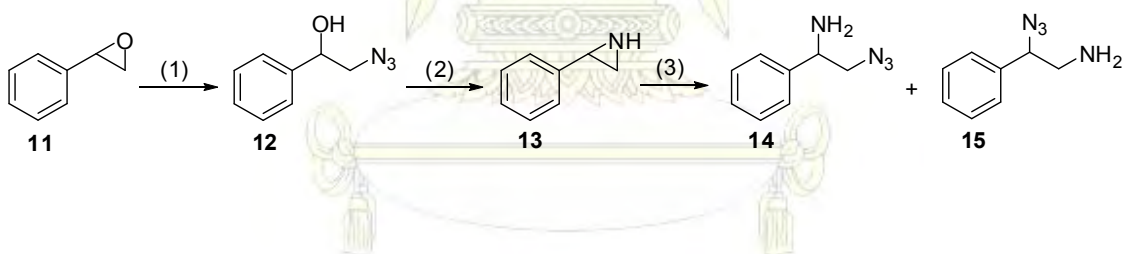
ทำเช่นเดียวกับการสังเคราะห์ข้างต้น แต่สำหรับขั้นที่ (2) ใช้ triphenylphosphine-polymer bound (393 mg, 1.5 mmol) และ ammonium chloride (8 mg, 0.15 mmol) เป็นรีเอเจนต์ในการทำปฏิกิริยาแทน tributyl phosphite และใช้ NMP เป็นตัวทำละลาย ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นจึงกรองเอา triphenylphosphine-polymer bound ออกด้วย suction filtration และล้างด้วย NMP เล็กน้อย แล้วจึงเก็บเอาสารละลายมาทำปฏิกิริยาต่อในขั้นที่ (3) โดยการเติม sodium azide (NaN_3 , 98 mg, 1.5 mmol) และ ammonium chloride (NH_4Cl , 70 mg, 1.3 mmol) และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ reflux ของ NMP (ประมาณ 204 °C) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำเอา triphenylphosphine-polymer bound ที่กรองออกไปกลับมาใส่ในขวดก้นกลมและให้ความร้อนที่อุณหภูมิ reflux ของ NMP อีกเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จึงหยุดปฏิกิริยาด้วยการหยุดให้ความร้อน

- การสังเคราะห์ครั้งที่ 6

ทำเช่นเดียวกับการสังเคราะห์ข้างต้น แต่สำหรับขั้นที่ (2) เติม triphenylphosphine-polymer bound (406 mg, 1.5 mmol) และ ammonium chloride (8 mg, 0.15 mmol) ใช้ NMP เป็นตัวทำละลาย ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงเติม triphenylphosphine-polymer bound (136 mg, 0.5 mmol) เพิ่ม และให้ความร้อนอีกเป็นเวลา 72 ชั่วโมง จึงทำปฏิกิริยาในขั้นที่ (3) ต่อ โดยการเติม sodium azide (NaN_3 , 101 mg, 1.5 mmol) และ ammonium chloride (NH_4Cl , 72 mg, 1.3 mmol) และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ reflux ของ NMP

เป็นเวลา 10 ชั่วโมง จากนั้นเติม sodium azide (NaN_3 , 135 mg, 2 mmol) และ ammonium chloride (NH_4Cl , 111 mg, 2 mmol) และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ reflux ของ NMP ประมาณ 10 mL เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงกรองเอา triphenylphosphine-polymer bound ออกด้วย suction filtration และล้างด้วย NMP เล็กน้อย แล้วนำสารละลายมาทำปฏิกิริยาต่อด้วยการเติม sodium azide (NaN_3 , 68 mg, 1 mmol) และ ammonium chloride (NH_4Cl , 56 mg, 1 mmol) และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ reflux ของ NMP เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จึงหยุดปฏิกิริยาด้วยการหยุดให้ความร้อน

2.3.5 การสังเคราะห์ amino azide 14 และ 15 จาก epoxide 11



รูปที่ 2.4 การสังเคราะห์ amino azide 14 และ 15 จาก epoxide 11

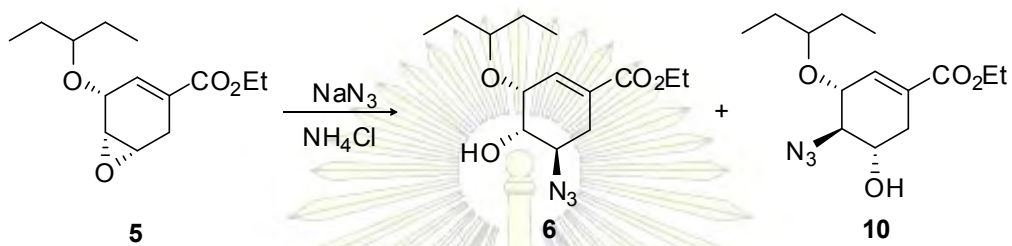
ในขั้นที่ (1) นำ (\pm)-styrene oxide (0.475 mL, 4.16 mmol) ใส่ในขวดก้นกลมขนาด 50 mL โดยเติม DMF ซึ่งเป็นตัวทำละลายปริมาตร 10 mL เติม sodium azide (NaN_3 , 1.352 g, 20.8 mmol) และ ammonium chloride (NH_4Cl , 1.113 g, 20.8 mmol) และต่อขวดก้นกลมเข้ากับ drying tube ที่บรรจุ anhydrous calcium chloride ใช้ sand bath เป็นตัวให้ความร้อนที่อุณหภูมิ

ประมาณ 50 °C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ในขั้นที่ (2) เติม triphenylphosphine (PPh_3 , 1.091 g, 4.16 mmol) และ ammonium chloride (NH_4Cl , 22 mg, 0.42 mmol) เติมลงไปในช่วงก้นกลม ให้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 70 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในขั้นที่ (3) เติม sodium azide (NaN_3 , 406 mg, 6.24 mmol) และ ammonium chloride (NH_4Cl , 289 mg, 5.41 mmol) ต่อช่วงก้นกลม เข้ากับ condenser และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ reflux ของ DMF (ประมาณ 154 °C) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จึงหยุดปฏิกิริยาด้วยการหยุดให้ความร้อน



บทที่ 3
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

3.1 การสังเคราะห์ hydroxyl azide 6 และ 10



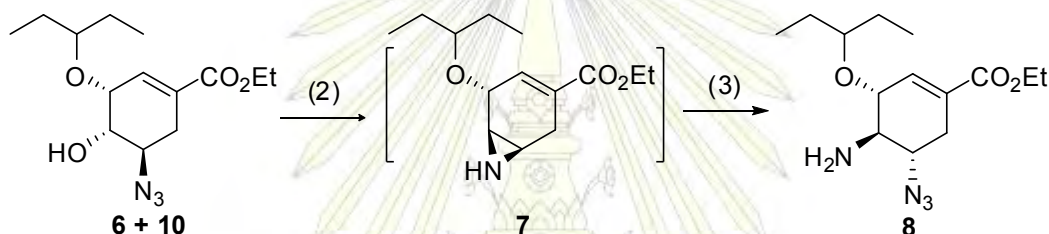
รูปที่ 3.1 การสังเคราะห์ hydroxyl azide 6 และ 10

จากงานวิจัยก่อนหน้า⁶ ซึ่งได้มีการสังเคราะห์ hydroxyl azide 6 และ 10 ในวิธีการเดียวกัน พบว่าได้ปริมาณผลิตภัณฑ์คิดเป็นผลได้ประมาณ 70 % ในงานวิจัยนี้จึงได้ทดลองโดยการใช้สภาวะปฏิกิริยาเช่นเดียวกันกับงานวิจัยก่อนหน้า⁶ โดยปฏิกิริยานี้เป็นปฏิกิริยาเปิดวงของ epoxide 5 โดยเกิดผ่านปฏิกิริยาการแทนที่ด้วย azide สภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาคือใช้ ethanol เป็นตัวทำละลาย และดำเนินปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผลิตภัณฑ์ที่ได้นั้นจะเป็นสารผสมของ hydroxyl azide 6 และ 10 ซึ่งเป็นเรซิโอไอโซเมอร์กัน หลังจากเสร็จสิ้นปฏิกิริยาจึงทำการกรองส่วนของ azide ที่มากเกินไปออกไปพบว่าได้น้ำหนักของผลิตภัณฑ์จากการทดลองสองครั้งคือ 0.351 g และ 0.357 g ตามลำดับ ซึ่งคิดเป็นผลได้คือประมาณ 88 % ซึ่งเป็นผลได้รวมของทั้งสองเรซิโอไอโซเมอร์ (ตารางที่ 3.1)

ตารางที่ 3.1 แสดงการสังเคราะห์ hydroxyl azide **6** และ **10**

ครั้งที่	ปริมาณสารตั้งต้น (g)	จำนวนโมล	ปริมาณผลิตภัณฑ์ (g)	% yield
1	0.399	1.57×10^{-3}	0.351	88
2	0.406	1.60×10^{-3}	0.357	88

3.2 การสังเคราะห์ amino azide **8** จาก hydroxyl azide **6** และ **10**



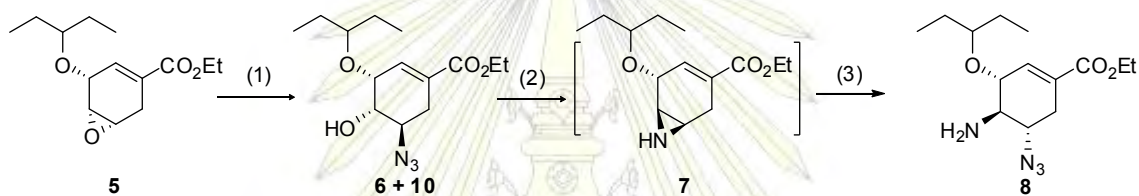
รูปที่ 3.2 การสังเคราะห์ amino azide **8** จาก hydroxyl azide **6** และ **10**

จากการแยกขั้นตอนปฏิบัติการในการสังเคราะห์ amino azide **8** จาก hydroxyl azide **6** และ **10** โดยการรวมสองขั้นตอนย่อยเข้าด้วยกันคือ ขั้นที่ (2) ซึ่งมีการใช้ PPh_3 และ NH_4Cl เป็นรีเอเจนต์ โดยมี DMF เป็นตัวทำละลาย ให้ความร้อนที่ 70°C และในขั้นที่ (3) ซึ่งมีการใช้ NaN_3 และ NH_4Cl เป็นรีเอเจนต์ และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ reflux ของ DMF พบว่าสามารถสังเคราะห์ amino azide **8** ได้ โดยจะได้น้ำหนักของ amino azide **8** จากการทดลองสองครั้งคือ 0.127 และ 0.126 g ตามลำดับ ซึ่งคิดเป็นผลได้คือ 39.8 และ 39.5 % ตามลำดับ (ตารางที่ 3.2)

ตารางที่ 3.2 แสดงการสังเคราะห์ amino azide 8 จาก hydroxyl azide 6 และ 10

ครั้งที่	ปริมาณสารตั้งต้น (g)	จำนวนโมล	ปริมาณผลิตภัณฑ์ (g)	% yield
1	0.320	1.08×10^{-3}	0.127	39.8
2	0.350	1.18×10^{-3}	0.126	39.5

3.3 การสังเคราะห์ amino azide 8 จาก epoxide 5



รูปที่ 3.3 การสังเคราะห์ amino azide 8 จาก epoxide 5

ปฏิกิริยานี้เป็นปฏิกิริยาการสังเคราะห์ amino azide 8 จาก epoxide 5 โดยการรวมทั้งสามขั้นตอนย่อยเข้าด้วยกันและต่อเนื่อง¹⁷ ซึ่งมีสภาวะในการทำปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.3 และทำการติดตามการเกิดปฏิกิริยาด้วยเทคนิค TLC โดยระบบที่ใช้คือ Hexane : EtOAc = 6:4 หลังจากเสร็จสิ้นปฏิกิริยาจึงนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปสกัดและแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี และวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์อีกครั้งด้วยเทคนิค ¹H NMR ซึ่งพบว่าสามารถสังเคราะห์ amino azide 8 ได้ โดยมีผลได้จากการทดลองคือ 35.1 % (ตารางที่ 3.3, entry 1)

ตารางที่ 3.3 แสดงการสังเคราะห์สาร amino azide **8** จาก epoxide **5**

Entry	ปริมาณสารตั้งต้น 5 (mmol)	รีเอเจนต์ (equiv) และสภาวะปฏิกิริยา* (รูปที่ 3.3)		ปริมาณผลิตภัณฑ์ 8 (g), (% yield)
		ขั้นที่ (2)	ขั้นที่ (3)	
1	1.57	PPh ₃ (1.0), NH ₄ Cl (0.1), DMF, 70 °C, 4 h	NaN ₃ (1.5), NH ₄ Cl (1.3), DMF, Reflux, 2 h	0.163, (35.1%)
2	1.60	PPh ₃ (1.0), NH ₄ Cl (0.1), DMSO, 70 °C, 3 h	NaN ₃ (1.5), NH ₄ Cl (1.3), DMSO, Reflux, 1.5 h	0.192, (47.3%)
3	1.00	PPh ₃ (1.0), NH ₄ Cl (0.1), NMP, 70 °C, 3.5 h	NaN ₃ (1.5), NH ₄ Cl (1.3), NMP, Reflux, 1.5 h	0.120, (40.5%)

* รีเอเจนต์และสภาวะของขั้นที่ (1) : NaN₃ 5.0 eq, NH₄Cl 5.0 eq, EtOH, 50 °C, 48 h.

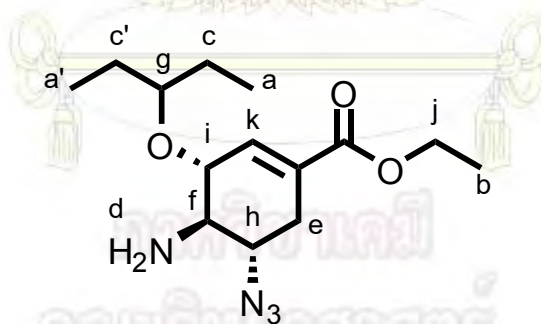
จากการทดลองเปลี่ยนชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสังเคราะห์จาก DMF เป็น DMSO และ NMP ในขั้นที่ (2) และ (3) ตามตารางที่ 3.3 พบว่าเมื่อทำการทดลองในทำนองเดียวกัน สามารถสังเกตการณ์ดำเนินไปของปฏิกิริยาด้วย TLC ได้เช่นเดิมและสามารถแยกผลิตภัณฑ์ออกมามีลักษณะเป็นของเหลวสีน้ำตาลเป็น amino azide **8** ปริมาณ 0.192 g และ 0.120 g ซึ่งคิดเป็น 47.3 และ 40.5% ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิค ¹H NMR ของผลิตภัณฑ์ **8** (หน้า 43) ตามรูปที่ 3.4 พบว่ามีสัญญาณเกิดขึ้น ตามตารางที่ 3.4 ซึ่งสอดคล้องกับสเปกตรัมในงานวิจัยก่อนหน้า¹¹ จึงสรุปได้ว่าสามารถสังเคราะห์ amino azide **8** ได้จริง และสนับสนุนสมมติฐานที่ว่า การให้ความร้อนที่สูงขึ้นในขั้นที่ (3) โดยการใช้ reflux DMSO และ NMP ทำให้ปฏิกิริยามีประสิทธิภาพมากขึ้น นั่นคือใช้เวลาน้อยกว่าและให้ผลิตภัณฑ์ปริมาณมากกว่า อย่างไรก็ตาม อุณหภูมิที่สูงขึ้นมิได้ทำให้ดีขึ้นเสมอไป ดังเช่นปฏิกิริยาใน NMP ที่มีจุดเดือดสูงกว่า แต่กลับให้ผลด้อยกว่าการทำ

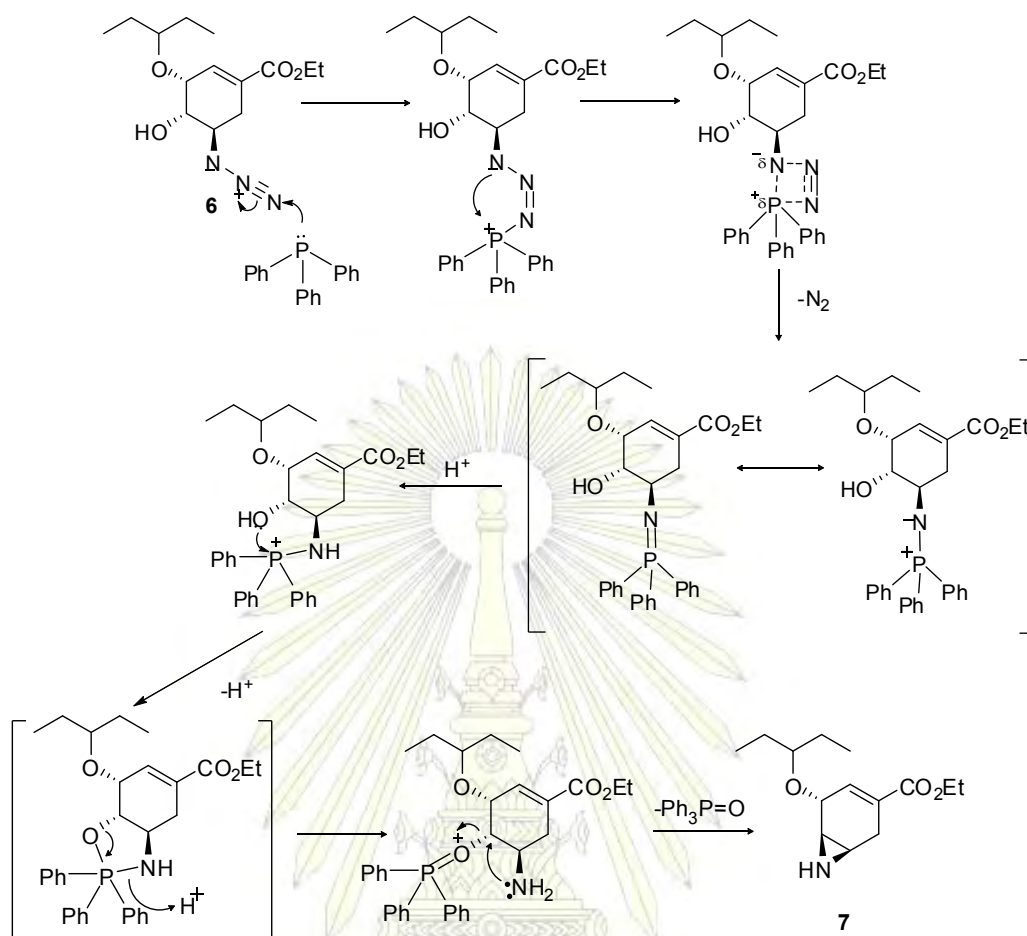
ปฏิกิริยาใน DMSO สำหรับกลไกปฏิกิริยาจากสาร **6** และ **10** ไปเป็นสาร **7** นั้น ได้แสดงไว้ในรูปที่ **3.5**

ตารางที่ **3.4** แสดงข้อมูลสัญญาณ ^1H NMR ของ amino azide **8**

สัญญาณ δ (ppm)	multiplicity	จำนวนโปรตอน	ตำแหน่ง (ตามรูปที่ 3.4)
0.91	triplet	6	a, a'
1.28	triplet	3	b
1.54	multiplet	4	c, c'
1.69	singlet	2	d
2.21-2.37	doublet	1	e
2.82-2.89	triplet	3	f
3.37	multiplet	1	g
3.40-3.52	multiplet	1	h
3.90	doublet	1	i
4.20	quartet	2	j
6.82	singlet	1	k



รูปที่ **3.4** แสดงโครงสร้างของ amino azide **8**



รูปที่ 3.5 แสดงกลไกปฏิกิริยารีดักชันของสาร **6** และการปิดวงไปเป็น aziridine **7**

เมื่อทำการปรับปรุงการทดลองโดยใช้กระบวนการที่คล้ายคลึงกับกระบวนการเดิมตามรูปที่ **3.3** และตารางที่ **3.3** แต่เปลี่ยนรีเอเจนต์และสภาวะในการทำปฏิกิริยา คือทดลองใช้ $\text{P}(\text{O}i\text{Bu})_3$ เป็นรีเอเจนต์แทน PPh_3 ในขั้นที่ (2) ดังแสดงในตารางที่ **3.5** entry 1 พบว่าในขั้นที่ (2) hydroxyl azide **6** และ **10** ถูกใช้ไปจนหมดเช่นเดิม แต่ปฏิกิริยาขั้นที่ (3) กลับพบว่าไม่เกิดปฏิกิริยา โดยไม่พบผลิตภัณฑ์ **8** อาจคาดได้ว่าสารประกอบ $\text{P}(\text{O}i\text{Bu})_3$ สามารถรีดิวซ์สาร **6** และ **10** ได้แต่ไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการปิดวงเป็น aziridine **7** หรืออาจจะทำให้เกิดการปิดวง แต่ไม่ช่วยให้เกิดการเปิดวงอีกครั้งไปเป็นผลิตภัณฑ์ **8** ที่ต้องการ หลังจากนั้นแม้ว่าจะใส่ PPh_3 เพิ่มเติมอีก 1 equiv แต่พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงจากการทดสอบด้วย TLC จึงคาดว่า

ปฏิกิริยาได้หยุดอยู่ในขั้นที่ (2) โดยรีเอเจนต์ใหม่อาจรบกวนการเกิดปฏิกิริยาในขั้นที่ (3) และเมื่อพยายามที่จะแยกผลิตภัณฑ์ที่ได้ ซึ่งคาดว่าจะเป็ aziridine 7 มาวิเคราะห์ พบว่าไม่สามารถแยกผลิตภัณฑ์นั้นออกมาได้ ซึ่งอาจจะเกิดจากการที่ intermediate ชนิดนี้มีความเสถียรต่ำ อาจสลายตัวภายในคอลัมน์โครมาโทกราฟีได้

ตารางที่ 3.5 แสดงการสังเคราะห์สาร amino azide 8 โดยเปลี่ยน phosphorus รีเอเจนต์

Entry	ปริมาณสารตั้งต้น 6 และ 10 (mmol)	รีเอเจนต์ (equiv) และสภาวะปฏิกิริยา* (รูปที่ 3.3)	
		ขั้นที่ (2)	ขั้นที่ (3)
1	1.2	P(OBu) ₃ (1.0), NH ₄ Cl (0.1), DMF, 70 °C, 6 h	NaN ₃ (3.0), NH ₄ Cl (2.6), DMF, Reflux, 8 h ; then PPh ₃ (1.0), DMF, Reflux 2 h
2	0.63	P(OBu) ₃ (2.0), NH ₄ Cl (0.2), DMF, 70 °C, 5 h	NaN ₃ (4.5), NH ₄ Cl (4.3), DMF, Reflux, 8 h
3	1.34	P(OPh) ₃ (1.0), NH ₄ Cl (0.1), DMF, 70 °C, 8 h	NaN ₃ (1.5), NH ₄ Cl (1.3), DMF, Reflux, 2 h
4	1.0	PPh ₃ -polymer bound (1.5), NH ₄ Cl (0.15), NMP, 70 °C, 4 h	NaN ₃ (1.5), NH ₄ Cl (1.3), NMP, Reflux, 5 h
5	1.04	PPh ₃ -polymer bound (2.0), NH ₄ Cl (0.15), NMP, 70 °C, 96 h	NaN ₃ (4.5), NH ₄ Cl (4.3), NMP, Reflux, 18 h

* รีเอเจนต์และสภาวะของขั้นที่ (1) : NaN₃ 5.0 eq, NH₄Cl 5.0 eq, EtOH, 50 °C, 48 h.

ในส่วนของ entry 2 จากตารางที่ 3.5 นั้น ได้มีการทดลองใส่รีเอเจนต์ P(OBu)₃ และ NH₄Cl ให้มากขึ้นเป็นสองเท่า เนื่องจากคาดว่าจะสามารถช่วยให้ปฏิกิริยาดำเนินไปข้างหน้าไปดีมากขึ้น แต่พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของตำแหน่งสารที่ได้จากขั้นที่ (2) เช่นเดิม แม้ว่าจะทำการเติมรีเอเจนต์เพิ่มเติมและให้เวลาในการดำเนินปฏิกิริยานานขึ้นอีกก็ตาม หรือแม้ว่าทำการ

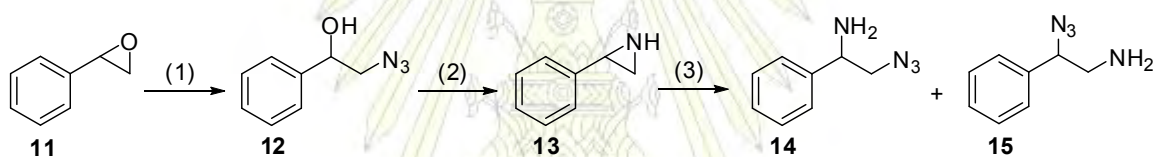
เปลี่ยนแปลงรีเอเจนต์ที่ใช้ในขั้นที่ (2) คือ $P(OPh)_3$ โดยใช้สภาวะการทดลองเดิม และให้เวลาในการทำปฏิกิริยานานขึ้นเป็น 6 ชั่วโมง ตาม entry 3 ตารางที่ 3.5 พบว่ายังคงไม่มีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นเมื่อติดตามปฏิกิริยาด้วยเทคนิค TLC จึงสรุปได้ว่า phosphite รีเอเจนต์ไม่สามารถเหนี่ยวนำปฏิกิริยาจาก hydroxyl azide **6** และ **10** ไปเป็น amino azide **8** ได้ โดยปัญหาที่คาดว่าจะอาจเกิดขึ้นซึ่งทำให้ปฏิกิริยาไม่สามารถเกิดขึ้นได้คือ การที่สารประกอบประเภท phosphite นั้น มีหมู่ที่เกาะอยู่กับฟอสฟอรัส เป็น $(OR)_3$ ซึ่งมีอะตอมของออกซิเจนที่มีค่าอิเล็กโตรเนกาติวิตีสูง จึงดึงอิเล็กตรอนออกจากฟอสฟอรัส ทำให้ความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ของสารประกอบประเภท phosphite นั้นลดลง จนอาจทำให้ไม่สามารถที่จะเปลี่ยน hydroxyl azide **6** และ **10** ไปเป็น amino azide **8** ได้ แนวทางในการแก้ไขปัญหานี้คือ การเปลี่ยนรีเอเจนต์ที่ใช้ หรือการใช้สภาวะปฏิกิริยาที่รุนแรงมากขึ้น

ในส่วนของ entry 4 และ 5 นั้น ได้มีการเปลี่ยนรีเอเจนต์ที่ใช้ในขั้นที่ (2) อีกครั้งหนึ่ง เป็น PPh_3 -polymer bound เนื่องจากรีเอเจนต์ PPh_3 -polymer bound สามารถทำการ recycle มาใช้ใหม่ได้ รวมถึงช่วยลดการทิ้งขยะฟอสฟอรัสในสิ่งแวดล้อม จาก entry 4 ตารางที่ 3.5 พบว่า PPh_3 -polymer bound นั้นสามารถที่จะทำปฏิกิริยากับ hydroxyl azide **6** และ **10** และเกิดเป็น aziridine **7** ได้ เช่นเดียวกับ PPh_3 ปกติ แต่เมื่อดำเนินปฏิกิริยาในขั้นที่ (3) ต่อกลับยังพบว่าไม่เกิดปฏิกิริยา โดยคาดว่าปฏิกิริยาได้หยุดอยู่ในขั้นตอนที่ (2) เช่นกัน รวมทั้งยังไม่สามารถแยกผลิตภัณฑ์ซึ่งคาดว่าจะเป็ aziridine **7** มาวิเคราะห์ได้ แม้ว่าจะได้มีการเพิ่มรีเอเจนต์และเวลาในการทำปฏิกิริยาก็ยังคงไม่ประสบผลสำเร็จ จึงสรุปได้ว่า PPh_3 -polymer bound รีเอเจนต์ไม่สามารถเหนี่ยวนำปฏิกิริยาจาก hydroxyl azide **6** และ **10** ไปเป็น amino azide **8** ได้ โดยปัญหาที่คาดว่าจะอาจเกิดขึ้นซึ่งทำให้ปฏิกิริยาไม่สามารถเกิดขึ้นได้คือ การที่ PPh_3 -polymer bound นั้นมี PPh_3 บางส่วนที่ไม่สามารถเข้าถึงเพื่อทำปฏิกิริยาได้ทั้งหมด จึงส่งผลให้

ไม่สามารถที่จะเปลี่ยน hydroxyl azide **6** และ **10** ไปเป็น amino azide **8** และอีกปัญหาที่คาดว่าจะอาจเกิดขึ้นได้คือ การที่ PPh₃-polymer bound นั้นอาจจะยึดติดอยู่กับ aziridine **7** ซึ่งทำให้ปฏิกิริยาในขั้นที่ (3) ไม่สามารถดำเนินต่อไปได้อันเนื่องมาจากการขัดขวางของสายพอลิเมอร์แนวทางในการแก้ไขปัญหานี้คือ อาจเพิ่มปริมาณของ PPh₃-polymer bound ในขั้นที่ (2) ให้มากขึ้น และใช้เวลาในการทำปฏิกิริยานานขึ้นด้วย

3.4 การทำปฏิกิริยาบน styrene oxide

ปฏิกิริยานี้เป็นการประยุกต์วิธีในการทำปฏิกิริยาที่ได้ศึกษามา โดยใช้สารตั้งต้นเป็น styrene oxide ซึ่งมีวิธีการทำปฏิกิริยาตามรูปที่ **3.6**



Reagents and Conditions : (1) NaN₃ 5.0 eq, NH₄Cl 5.0 eq, EtOH, 50 °C, 10 h ; (2) PPh₃ 1.0 eq, NH₄Cl 0.1 eq, DMF, 70 °C, 1.5 h ; (3) NaN₃ 1.5 eq, NH₄Cl 1.3 eq, DMF, Reflux, 2.5 h

รูปที่ 3.6 การสังเคราะห์ amino azide **14** และ **15** จาก Styrene oxide **11**

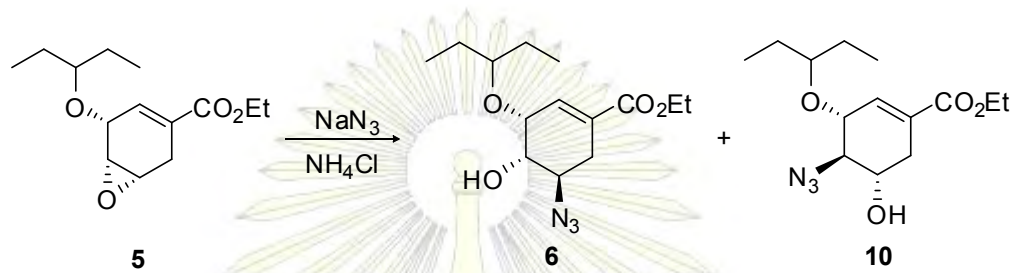
ในขั้นที่ (1) ภายหลังจากทำปฏิกิริยาประมาณ 10 ชั่วโมง สารตั้งต้นจึงหมดและเกิดจุดของสารชนิดใหม่ขึ้นเมื่อตรวจสอบด้วย TLC โดยระบบที่ใช้คือ Hexane : EtOAc ในอัตราส่วน 6:4 ($R_f = 0.56, 0.46$) ซึ่งคาดว่าเป็นของผสมเรจิโอไอโซเมอร์ของสาร **12** จึงดำเนินปฏิกิริยาในขั้นที่ (2) โดยใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาประมาณ 1.5 ชั่วโมง พบว่าจุดสารบน TLC ที่ $R_f = 0.56, 0.46$ จางหายไปและได้จุดสารชนิดใหม่เกิดขึ้นบน TLC ($R_f = 0.17$) ซึ่งคาดว่าจะจะเป็น aziridine intermediate **13** และเมื่อดำเนินปฏิกิริยาต่อในขั้นที่ (3) เป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง จะพบจุดของสารผลิตภัณฑ์ชนิดใหม่เกิดขึ้นอีกบน TLC ($R_f = 0.24$) ในขณะที่สารที่ $R_f = 0.17$ จางลงจนหมด

ซึ่งสารผลิตภัณฑ์ชนิดใหม่ที่เกิดขึ้นนั้น มีค่า R_f ตรงพอดีกับจุดของ triphenylphosphine oxide (PPh_3O) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่ได้จากปฏิกิริยาของ PPh_3 ที่ต้องแยกออกจากของผสม จากความพยายามนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี พบว่าไม่สามารถแยกผลิตภัณฑ์ออกจากกันได้ ซึ่งเป็นไปได้ว่าสารมีปริมาณน้อยและยังใช้ระบบการแยกที่ไม่เหมาะสม หรือสารผลิตภัณฑ์ที่ไม่เสถียรเพียงพอและเสียไปในคอลัมน์ จึงยังไม่สามารถสรุปได้ว่าปฏิกิริยาสามารถเกิดขึ้นได้ในกรณีนี้ สำหรับข้อเสนอแนะในการแก้ปัญหาการแยกสารผลิตภัณฑ์ที่มีค่า R_f ตรงพอดีกับจุดของ PPh_3O นั้น อาจทำได้โดยการเปลี่ยนรีเอเจนต์ PPh_3 ที่ใช้ เพื่อให้ผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่เกิดจาก PPh_3 นั้นมีค่า R_f ต่างออกไปจากผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ



บทที่ 4
สรุปผลการทดลอง

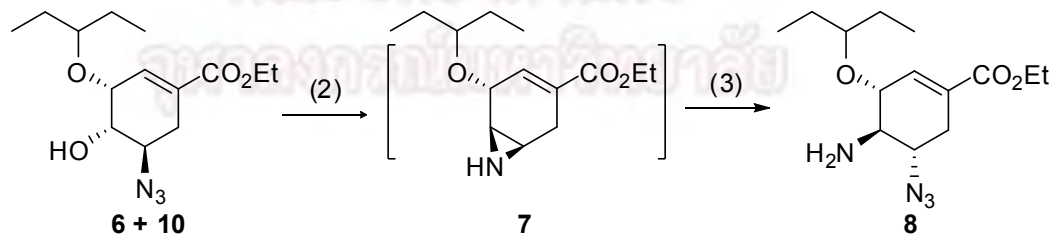
1. การสังเคราะห์ hydroxyl azide 6 และ 10



รูปที่ 4.1 การสังเคราะห์ hydroxyl azide 6 และ 10

จากการทดลองสังเคราะห์ hydroxyl azide 6 และ 10 จากปฏิกิริยาเปิดวงของ epoxide 5 โดยเกิดผ่านปฏิกิริยาการแทนที่ด้วย azide ได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นของผสมระหว่างสองเรจิโอไอโซเมอร์ คือ hydroxyl azide 6 และ 10 มีผลได้โดยรวมของทั้งสองเรจิโอไอโซเมอร์คือ 88%

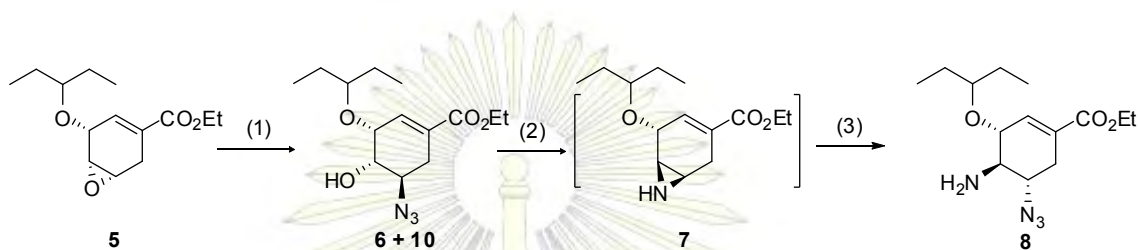
2. การสังเคราะห์ amino azide 8 จาก hydroxyl azide 6 และ 10



รูปที่ 4.2 การสังเคราะห์ amino azide 8 จาก hydroxyl azide 6 และ 10

จากการสังเคราะห์ amino azide **8** จาก hydroxyl azide **6** และ **10** โดยการรวมขั้นที่ (2) และ (3) เข้าด้วยกัน พบว่าจะได้ผลิตภัณฑ์คือ amino azide **8** โดยมีผลได้จากการทดลอง 2 ครั้งคือ 39.8 และ 39.5 % ตามลำดับ

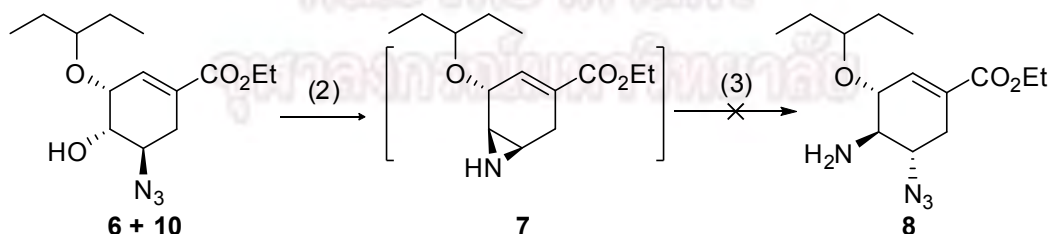
3. การสังเคราะห์ amino azide **8** จาก epoxide **5**



รูปที่ 4.3 การสังเคราะห์ amino azide **8** จาก epoxide **5**

จากการทดลองสังเคราะห์ amino azide **8** จาก epoxide **5** โดยรวมทั้ง 3 ขั้นตอนย่อย เข้าด้วยกันและต่อเนื่อง พบว่าสามารถสังเคราะห์ amino azide **8** ได้ โดยมีผลได้คือ 35.1, 47.3 และ 40.5 % เมื่อใช้ตัวทำละลายในปฏิกิริยาเป็น DMF, DMSO และ NMP ตามลำดับ

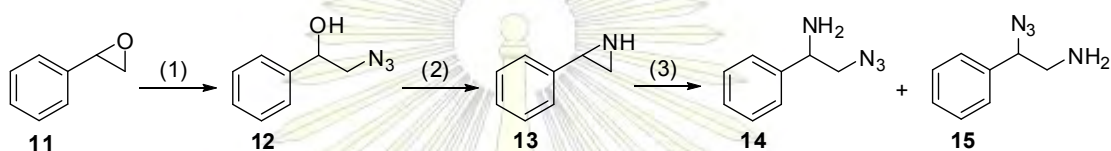
4. การสังเคราะห์ amino azide **8** จาก hydroxyl azide **6** และ **10** โดยเปลี่ยน phosphine รีเอเจนต์ในขั้นที่ (2)



รูปที่ 4.4 การสังเคราะห์ amino azide **8** จาก hydroxyl azide **6** และ **10** โดยเปลี่ยนรีเอเจนต์ในขั้นที่ (2)

จากการทดลองสังเคราะห์ amino azide **8** จาก hydroxyl azide **6** และ **10** โดยมีการเปลี่ยนรีเอเจนต์ในขั้นที่ (2) ตามตารางที่ **3.3** พบว่า ทั้ง phosphite รีเอเจนต์ และ PPh₃-polymer bound รีเอเจนต์ ไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาจาก hydroxyl azide **6** และ **10** ไปเป็น amino azide **8** ได้

5. การทำปฏิกิริยาบน styrene oxide



รูปที่ 4.5 การสังเคราะห์ amino azide **14** และ **15** จาก Styrene oxide **11**

จากการทดลองใช้วิธีในการทำปฏิกิริยาที่ได้ศึกษามา โดยเปลี่ยนสารตั้งต้นเป็น styrene oxide นั้น ยังไม่สามารถที่จะสรุปได้อย่างแน่นอนว่ามีปฏิกิริยาเกิดขึ้นหรือไม่ เนื่องจากคาดว่าตำแหน่งที่ปรากฏจุดสารบน TLC ของผลิตภัณฑ์มีค่าตรงพอดีกับจุดของ triphenylphosphine oxide (PPh₃O) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ร่วมที่ได้จากปฏิกิริยาออกซิเดชันของ PPh₃ ซึ่งทำให้ไม่สามารถแยกผลิตภัณฑ์ออกจากของผสม เพื่อนำไปวิเคราะห์ได้

บรรณานุกรม

1. จิตร สิทธิอมร, นิวัตร จันท์ศิริพรชัย, สมศักดิ์ ภัคภิญโญ, จิโรจ ศศิปรีย์จันทร์, คณิศศักดิ์ อรวิระกุล, ยง ภู่วรรณ, ศุภชัย เนื่อนवलสุวรรณ, สันนิภา สุรทัศน์, วิจิตร บรรณนารา, รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช, รัตยา ลือชาพุฒิพร, วิชชุตตา ธนกิจเจริญวัฒน์, ภูรี อนันต์โชติ, อลงกร อมรศิลป์, สุทธิพร จิตต์มิตรภาพ. *ไขหวัดนก..พลิกสถานการณ์ด้วยความรู้*, พิมพ์ครั้งที่ 1, สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, **2550**.
2. ยง ภู่วรรณ, จาริกา มากคช และ สัญชัย พยุงกร. “ไขหวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 รู้ทัน ป้องกันได้” หมอชาวบ้าน 31, 326 (มิถุนายน 2552): 18-28.
3. http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_nih/a_nih_1_001c.asp?info_id=893 (accessed on 10-02-2014)
4. พิไลพันธ์ พุฒินะ, ไร่สวีทยา. พิมพ์ครั้งที่ 2 สำนักพิมพ์อักษรสมัย กรุงเทพฯ, **2534**
5. <http://www.fortmengraihospital.com/8Rok.html> (accessed on 10-02-2014)
6. <https://www.nstda.or.th/index.php/knowledge-analytic/1236-h1n1-2009> (accessed on 10-02-2014)
7. http://www.nature.com/nrd/journal/v6/n12/fig_tab/nrd2400_F2.html (accessed on 10-02-2014)
8. Kim, C. U.; Lew, W.; Williams, M. A.; Liu, H.; Zhang, L.; Swaminathan, S.; Bischofberger, N.; Chen, M. S.; Mendel, D. B.; Tai, C. Y.; Laver, W. G.; Stevens, R. C. Influenza Neuraminidase Inhibitors Possessing a Novel Hydrophobic Interaction in the

- Enzyme Active Site: Design, Synthesis, and Structural Analysis of Carbocyclic Sialic Acid Analogues with Potent Anti-Influenza Activity. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 681-690.
9. Kim, C. U.; Lew, W.; Williams, M. A.; Wu, H.; Zhang, L.; Chen, X.; Escarpe, P. A.; Mendel, D. B.; Laver, W. G.; Steven, R. C. Structure-Activity Relationship Studies of Novel Carbocyclic Influenza Neuraminidase Inhibitors. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 2451-2460.
10. Federspiel, M.; Fischer, R.; Henning, M.; Mair, H-J.; Oberhauser, T.; Rimmler, G.; Albiez, T.; Bruhin, J.; Estermann, H.; Gandert, C.; Gockel, V.; Gotzo, S.; Hoffmann, U.; Huber, G.; Janatsch, G.; Lauper, S.; Rockel-Stabler, O.; Trussardi, R.; Zwahlen, A. G. Industrial Synthesis of the Key Precursor in the Synthesis of the Anti-Influenza Drug Oseltamivir Phosphate (Ro 64-0796/002, GS-4104-02): Ethyl(3R,4S,5S)-4,5-epoxy-3-(1-ethyl-propoxy)-cyclohex-1-ene-1-carboxylate. *Org. Process Res. Dev.* **1999**, *3*, 266-274.
11. Rohloff, J. C.; Kent, K. M.; Postich, M. J.; Becker, M. W.; Chapman, H. H.; Kelly, D. E.; Lew, W.; Louie, M. S.; McGee, L. R.; Prisbe, E. J.; Schultze, L. M.; Yu, R. H.; Zhang, L. Practical Total Synthesis of the Anti-Influenza Drug GS-4101. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 4545-4550.
12. Karpf, M.; Trussardi, R. European Patent EP 1 059 283 A1, Dec 13, 2000.

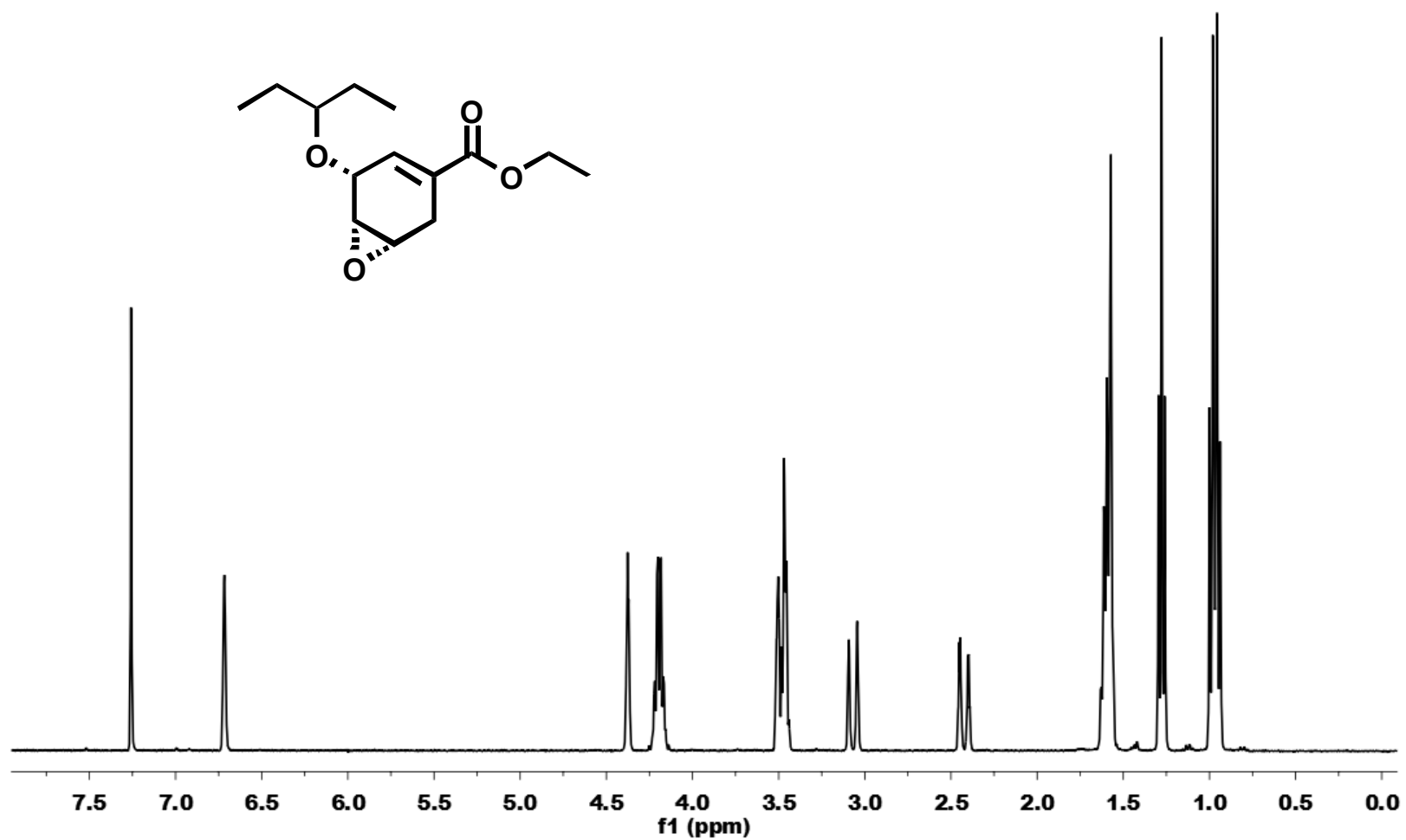
13. Karpf, M.; Trussardi, R. New, Azide-Free Transformation of Epoxides into 1,2-Diamino Compounds: Synthesis of the Anti-Influenza Neuraminidase Inhibitor Oseltamivir Phosphate (Tamiflu). *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 2044-2051.
14. Harrington, P. J.; Brown, J. D.; Foderaro, T.; Hughes, R. C. Research and Development of a Second-Generation Process for Oseltamivir Phosphate, Prodrug for a Neuraminidase Inhibitor. *Org. Process Res. Dev.* **2004**, *8*, 86-91.
15. Legters, J.; Thijs, L.; Zwanenburg, B. A convenient synthesis of optically active 1H-aziridine-2-carboxylic acids (esters). *Tetrahedron Lett.* **1989**, *36*, 4881-4884.
16. Popsavin, V.; Benedekovic, G.; Popsavin, M.; Sreco, B.; Djokovic, D. Regiochemistry of epoxide ring opening in methyl 2,3-anhydro-4-azido-4-deoxy- α - and β -L-lyxopyranosides. *Carbohydrate Research.* **2005**, *340*, 1866-1871.
17. Suteepicheatpun, W.; Synthesis of Diamino Moieties of Oseltamivir. Degree of Master of Science Program in Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 2011.

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

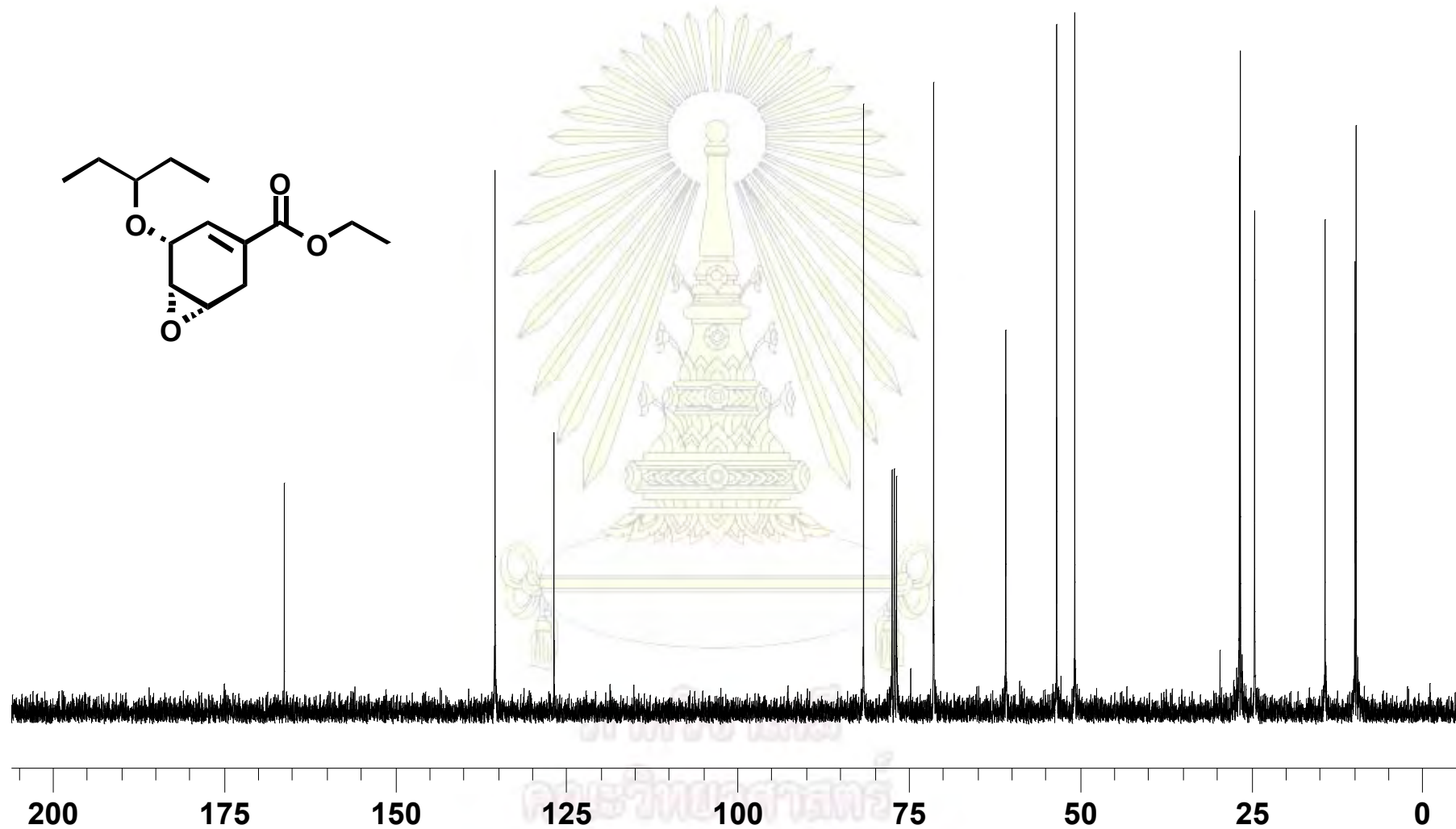


ภาคผนวก

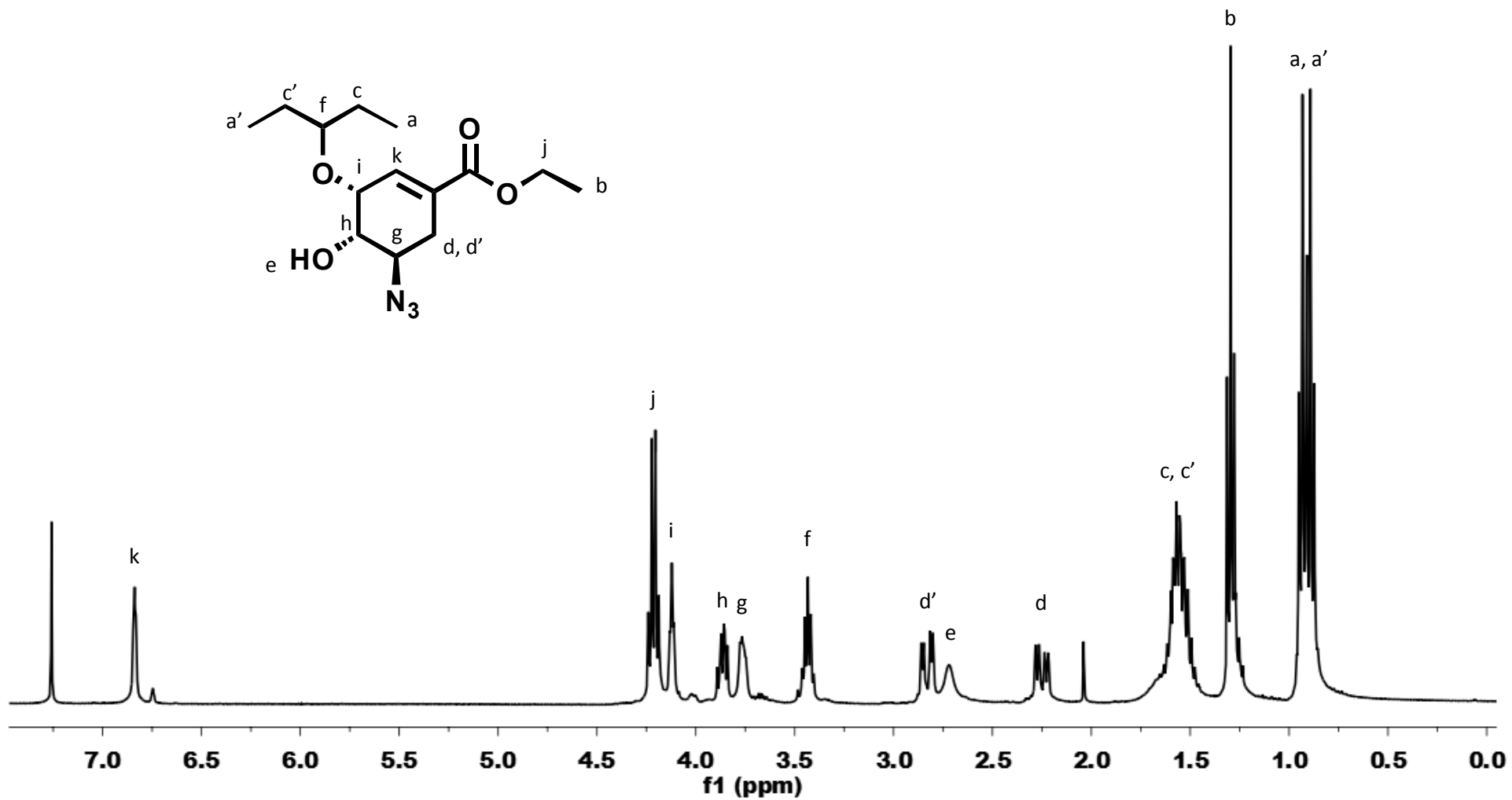
ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



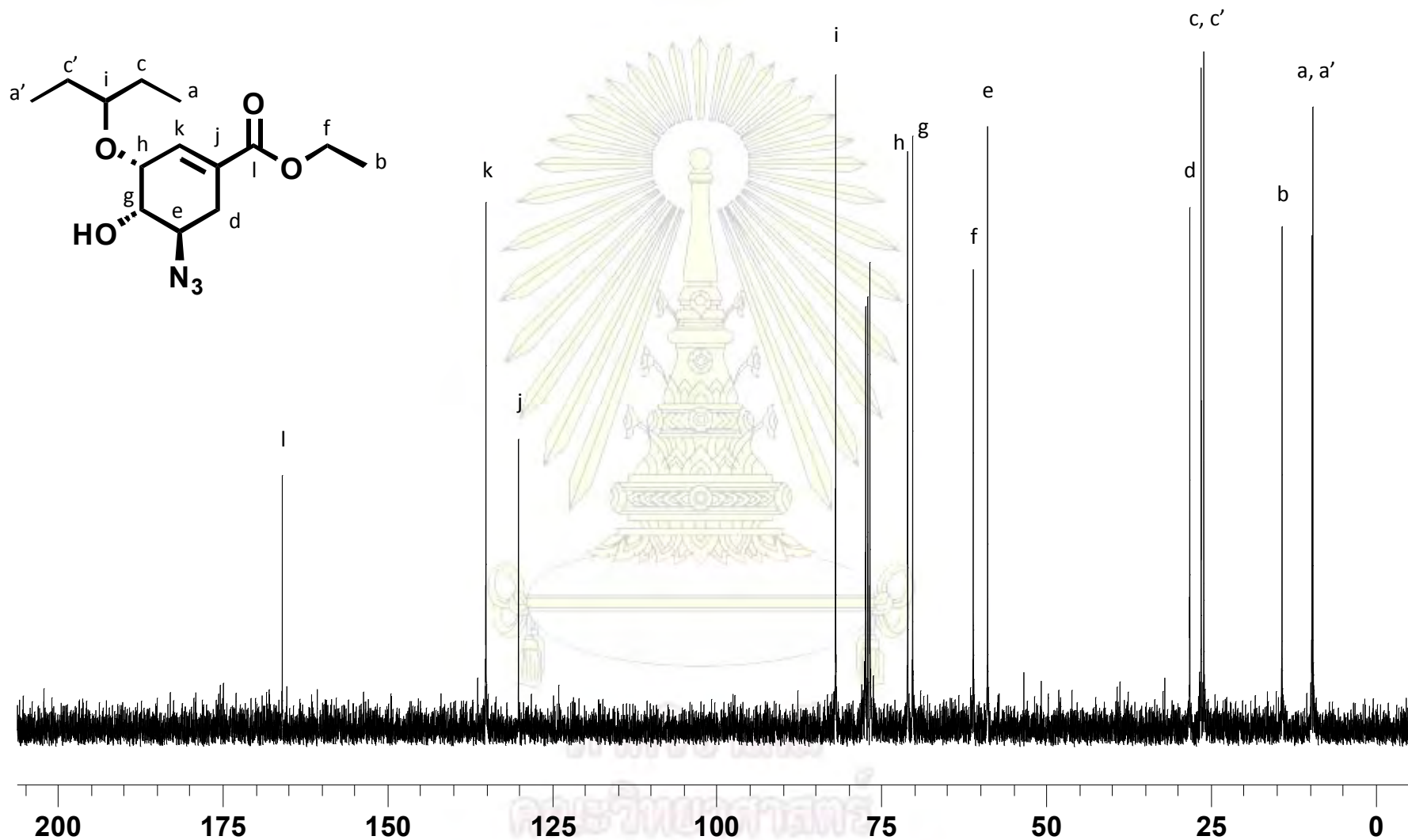
รูปที่ ผ.1 ^1H NMR spectrum (CDCl_3) ของสาร (3R,4R,5S)-4,5-epoxy-3-(1-ethylpropoxy)-1-cyclohexene-1-carboxylate (epoxide 5)



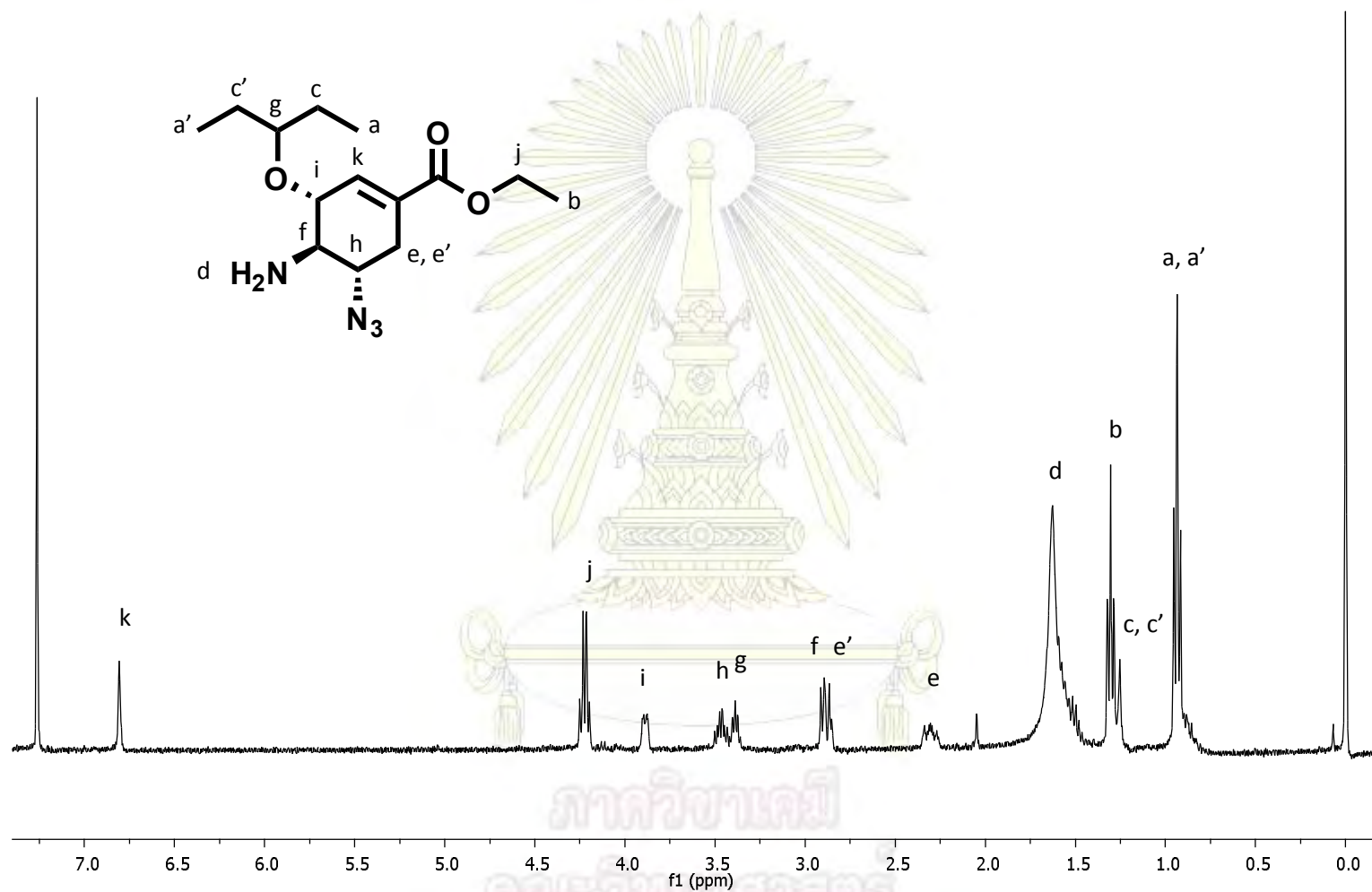
รูปที่ ผ.2 ^{13}C NMR spectrum (CDCl₃) ของสาร (3R,4R,5S)-4,5-epoxy-3-(1-ethylpropoxy)-1-cyclohexene-1-carboxylate (epoxide 5)



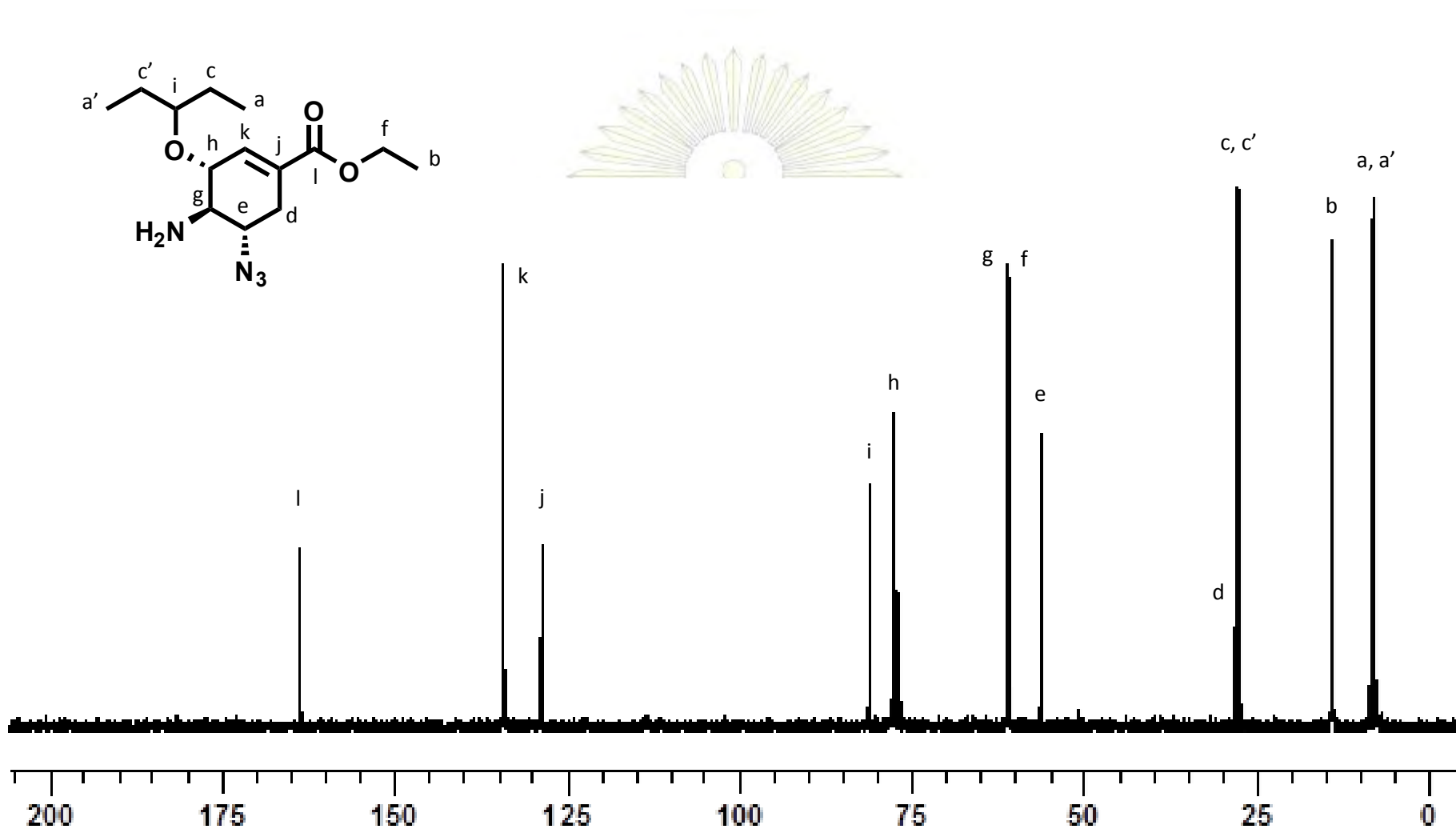
รูปที่ ๓.3 ^1H NMR spectrum (CDCl_3) ของสาร ethyl (3R,4S,5R)-5-Azido-3-(1-ethylpropoxy)-4-hydroxycyclohexene-1-carboxylate (hydroxyl azide **6**)



รูปที่ ๘.๔ ^{13}C NMR spectrum (CDCl_3) ของสาร ethyl (3R,4S,5R)-5-Azido-3-(1-ethylpropoxy)-4-hydroxycyclohexene-1-carboxylate (hydroxyl azide 6)



รูปที่ ๕.5 ^1H NMR spectrum (CDCl_3) ของสาร ethyl (3R,4R,5S)-4-Amino-5-azido-3-(1-ethylpropoxy)-1-cyclohexene-1-carboxylate (amino azide **8**)



รูปที่ ๘.๖ ^{13}C NMR spectrum (CDCl_3) ของสาร ethyl (3R,4R,5S)-4-Amino-5-azido-3-(1-ethylpropoxy)-1-cyclohexene-1-carboxylate (amino azide **8**)

ประวัติผู้ทำการวิจัย

นายคุณุตม์ ตั้งสง่าศักดิ์ศรี เกิดเมื่อวันที่ 21 สิงหาคม พ.ศ. 2535 ที่จังหวัดสงขลา สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย สายสามัญ แผนก วิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์ จากโรงเรียนแสงทองวิทยา เมื่อปีการศึกษา 2552 เคยได้รับรางวัลเกียรติบัตรการแข่งขันเคมีโอลิมปิกระดับชาติครั้งที่ 5 โดยได้รับคะแนน ดี ในการแข่งขันครั้งนี้ เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2553 และได้รับทุนการศึกษาจาก โครงการพัฒนาและส่งเสริมผู้มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (พสวท.) สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ หลังจบการศึกษาระดับปริญญาตรี 15/6 ถ.มนตรี 1 อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90110



ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย